Über Darstellung und Wirkungen proteolytisch einheitlicher Arginase.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Philosophischen Fakultät Sektion II der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
am 20. November 1928
von

Herbert Finkelscherer
aus München.

München

Druck der Salesianischen Offizin.

Über Darstellung und Wirkungen proteolytisch einheitlicher Arginase.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Philosophischen Fakultät Sektion II der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
am 20. November 1928
von

Herbert Finkelscherer
aus München.

München

Druck der Salesianischen Offizin.

Berichterstatter: Geh. R. Prof. Dr. H. Wieland.

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1928.

Meinen Eltern.

Die vorliegende Arbeit wurde im Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München ausgeführt.

Es sei mir gestattet meinen hochverehrten Lehrern,
Herrn Professor Dr. E. Waldschmidt-Leitz,
von dem die Anregung zu dieser Arbeit ausging, und
Herrn Privat-Dozenten Dr. W. Grassmann,
für ihre jederzeit gewährte Unterstützung meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Zu besonderem Danke fühle ich mich
Herrn Geheimrat Professor Dr. H. Wieland
für das meiner Arbeit stets entgegengebrachte Interesse und
Herrn Geheimrat Professor Dr. R. Willstätter
für seine Anteilnahme an meinem Studium verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis.

Einleitung 7

Allgemeiner Teil.

I. Die Bestimmung der Enzyme 9
1. Arginase 9
2. Peptidase 11
3. Protease 12
II. Versuche zur Darstellung proteolytisch einheitlicher Arginase.
1. Adsorptionsmethoden 12
Anhang: Fällung und Dialyse 15
2. Beständigkeit 15
3. Hemmung, „Vergiftung“ 16
III. Zur Spezifität der Arginase 19
IV. Versuche mit Verdauungsprodukten der Protamine . . . 24

Experimenteller Teil.

Enzymmaterial 26
I. Die Bestimmung der Enzyme.
1. Die Bestimmung der Arginase 26
2. Die Bestimmung des Lebererepsins 33
3. Zur Bestimmung der Protease 38
II. Versuche zur Gewinnung proteolytisch einheitlicher Arginaselösung.
1. Adsorptionsversuche 39
2. Beständigkeitsversuche 45
3. Hemmung und Vergiftung 46
III. Spezifitätsversuche an synthetischen Substraten . . . 52
IV. Versuche an Protaminen und deren Abbauprodukten . . 54

Einleitung.

Die Arginase, jenes Enzym der Leber, das d-Arginin in Ornithin und Harnstoff zerlegt, hat bald nach ihrer Entdeckung durch A. Kossel und H. D. Dakin[1] im Jahre 1904 eine Reihe von Bearbeitern auf chemischem und physiologischem Gebiete gefunden. Denn ihr Substrat, das Arginin, ist nicht nur in allen Eiweißstoffen enthalten — in den einfacher gebauten Histonen und Protaminen sogar in überwiegender Menge —, es findet sich auch im Gift der Kröte[2] und erregt neuerdings besonderes Interesse als Träger der Muskelphosphorsäure, als Bestandteil des „Phosphagens" der Wirbellosen[3]. Andererseits sah man hier eine Quelle des Harnstoffs im Organismus und hoffte etwas über die ungeklärte Herkunft des Kreatins erfahren zu können.

So untersuchten verschiedene Forscher die Verbreitung der Arginase; genannt seien hier S. Edlbacher, der ihr Vorkommen in den einzelnen Organen sicherstellte[4] und der Beziehung zu Veränderungen des Stoffwechsels nachging[5], und A. Kiesel, der ihre Rolle im Pflanzenreich erforschte[6]. So prüfte man die Angreifbarkeit verschiedener Guanidinabkömmlinge durch das Enzym, während eigentliche Argininderivate erst in neuerer Zeit herangezogen wurden.

Aber noch in anderer Beziehung wurde die Arginase von Bedeutung für die physiologische Chemie: sie ermöglichte noch vor

---

[1] Z. f. physiol. Chem. **41**, 321 (1904).

[2] H. Wieland u. R. Alles, Ber. **55**, 1789 (1922).

[3] O. Meyerhof u. K. Lohmann, Naturw. **16**, 47 (1928); Biochem. Z. **196**, 22, 49 (1928); O. Meyerhof, Arch. di Sci. biol. **12**, 536 (1928) (zitiert nach Naturw. **16**, 726).

[4] S. Edlbacher u. P. Bonem, Z. f. physiol. Chem. **145**, 69 (1925).

[5] S. Edlbacher u. H. Röthler, Z. f. physiol. Chem. **148**, 273 (1925) (Sexualität); S. Edlbacher u. K. W. Merz, Z. f. physiol. Chem. **171**, 252 (1927) (Tumore

[6] Z. f. physiol. Chem. **75**, 169 (1911); **118**, 267 (1922).

Kossels Flavianatmethode[7] eine bequeme Bestimmung des Arginins. B. C. P. Jansen[8], der 1917 in der Anwendung der Urease ein sicheres Verfahren zur Messung des gebildeten Harnstoffs einführte, ermittelte so den Argininingehalt von Proteinen, die er durch Säure hydrolysiert hatte. Ähnlich wiesen M. Sandberg und E. Brand[9] im Insulin Arginin nach, das sie durch Einwirkung eines Gemisches eiweißspaltender Fermente freilegten.

Einen besonders hohen Gehalt an Arginin weisen bekanntlich die Protamine des Fischspermas auf. An ihnen war es E. Waldschmidt-Leitz[10] durch Anwendung reiner proteolytischer Enzyme gelungen den Abbau auf bestimmten Stufen festzuhalten — ein Ziel, das durch partielle Hydrolyse mit Säuren nicht erreicht werden kann. Die quantitativen Verhältnisse der auf den einzelnen Stufen freigelegten Gruppen schienen ziemlich übersichtlich und für weitere Untersuchungen günstig. Zur Aufklärung der, wie erwähnt, sehr argininreichen Reaktionsprodukte versprach die Anwendung der Arginase einen wichtigen Beitrag zu liefern. Denn wie Kossel und Dakin[11] sehr wahrscheinlich machten und meine Versuche bestätigen, werden die Protamine selbst von Arginase nicht angegriffen. So konnte der vorliegenden Arbeit die Aufgabe gestellt werden zu untersuchen: Auf welcher Stufe der Verdauung und in welchen Mengen tritt das Arginin in einer Form auf, die durch Arginase angreifbar ist? Zur Beurteilung der dabei erhaltenen Ergebnisse war an synthetischem Material die Frage weiter zu klären, ob nur freies Arginin oder auch Derivate desselben durch Arginase gespalten werden können. Natürlich durfte die angewandte Enzymlösung nicht neuerdings Peptidbindungen lösen. Somit war es Voraussetzung der Untersuchung und erstes Ziel der Arbeit, die Arginase von Proteasen und Peptidasen zu befreien, die sie in der sehr enzymreichen Leber begleiten.

[7] A. Kossel u. R. E. Gross, Z. f. physiol. Chem. **135**, 167 (1924).

[8] Chem. Weekblad **14**, 125 (C. 1917, I, 913).

[9] Proc. of the Soc. of exp. biol. and med. **24**, 373 (C. 1927, II, 2203).

[10] E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner u. W. Grassmann, Z. f. physiol. Chem. **156**, 68 (1926) (Clupein); E. Waldschmidt-Leitz u. Th. Kollmann, Z. f. physiol. Chem. **166**, 262 (1927) (Salmin, Scombrin, Sturin).

[11] Z. f. physiol. Chem. **42**, 185 (1904).

Allgemeiner Teil.

I. Die Bestimmung der Enzyme.

Für die Trennung oder Reinigung von Enzymen ist ihre quantitative Bestimmung notwendig um den Erfolg der einzelnen Operationen feststellen zu können. Die Bestimmung erfordert die Berücksichtigung der äusseren Faktoren, insbesondere des Einflusses der Acidität; sie wird vereinfacht, wenn es gelingt einfache kinetische Gesetzmässigkeiten aufzufinden.

1. Arginase.

Die ersten Bearbeiter beschränkten sich auf den Nachweis der Bildung von Harnstoff und Ornithin oder auch der Abnahme des Argininstickstoffs. Die erste quantitative Methode schufen in Kossels Laboratorium A. Clementi[12] und S. Edlbacher[13], die die freigelegte δ-Aminogruppe des Ornithins durch Formoltitration nach Sörensen erfassten. Das Verfahren erlaubte R. E. Gross[14] kinetische Messungen; aber es wird unsicher, wenn das Ornithin weiteren Veränderungen unterliegt, wie in der Vogelniere[4] (die Vögel scheiden Dibenzoyl-ornithin [Ornithursäure] aus), und es eignet sich nicht, wenn gleichzeitig proteolytische Vorgänge den NH_2-Gehalt der Reaktionslösung ändern. Darum ging man allgemein dazu über, den gebildeten Harnstoff zu bestimmen. Jansen[8] (und nach ihm Edlbacher[4], [15]) zerlegte ihn durch Urease und destillierte das Ammoniak nach O. Folin[16] über, während A. Hunter

[12] Atti R. Accad. Lincei (5) **23**, II, 517 (1914).
[13] Z. f. physiol. Chem. **95**, 81 (1915); **100**, 111 (1917).
[14] Z. f. physiol. Chem. **112**, 236 (1921).
[15] S. Edlbacher u. H. Röthler, Z. f. physiol. Chem. **148**, 264 (1925).
[16] Z. f. physiol. Chem. **37**, 161 (1902/03).

und J. A. Dauphinee[17] die Ammoncarbonatbildung durch Urease kolorimetrisch verfolgten, A. Bonot und Th. Cahn[18] den Harnstoff mit Xanthydrol ausfällten und wogen. Für meine Zwecke am geeignetsten erschien das Verfahren von Jansen-Edlbacher, das das Reaktionsprodukt getrennt von allen übrigen Lösungsbestandteilen misst.

Die optimale Wasserstoffionenkonzentration bestimmten erst Hunter und Dauphinee (loc. cit. und zwar S. 219) zu p_H 9,8, Edlbacher und Bonem[4] zu p_H 9,5 bis 9,9; anfangs hatte man bei neutraler Reaktion oder der Acidität des Blutes gearbeitet. Aber S. Hino[19] fand wieder p_H 7,4 und darauf Edlbacher und E. Simons[20] p_H 9,0 als optimale Reaktion. Darum prüfte ich das Verhalten meines Materials und erhielt in mehreren Versuchen übereinstimmend das Optimum bei p_H 9,5 bis 9,7.

Bezüglich der Kinetik der Reaktion fand Gross[14], dass sie bei p_H 7,3 nicht monomolekular verläuft, vielmehr nahmen die nach der Gleichung $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ berechneten Werte für k beträchtlich ab. Er konnte zeigen, dass die Spaltung durch das Spaltprodukt Ornithin beträchtlich, durch Harnstoff kaum gehemmt wird.

Da der Reaktionsverlauf bisweilen von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt, verfolgte ich ihn bei optimaler Reaktion. Aber ich fand die gleiche, selbst in Einzelheiten ähnliche Abnahme der k-Werte. Ein Zusatz von Glycerin, das stabilisierend wirken sollte, änderte daran nichts; Zerstörung des Enzyms unter den Versuchsbedingungen ist auch nach den sonstigen Befunden nicht wahrscheinlich.

Bei zahlreichen Enzymreaktionen, z. B. beim Pepsin[21], gilt eine allgemeinere Gesetzmässigkeit: „Die für den gleichen Umsatz benötigten Zeiten sind den Enzymmengen umgekehrt proportional.“ Diese Beziehung fand ich an der Arginase nur in engen Grenzen

---

[17] Proc. Roy. Soc. London **97**, 209 (1924/25).
[18] C. r. Acad. Sciences **184**, 246 (C. 1927, I, 2456).
[19] Jl. Biochemistry **6**, 335 (1926).
[20] Z. f. physiol. Chem. **167**, 76 (1927).
[21] E. Waldschmidt-Leitz u. E. Simons, Z. f. physiol. Chem. **156**, 114 (1926

erfüllt; bei stärkerer Variation der Enzymmenge blieben die Umsätze durch die kleinere Menge und in längeren Zeiten stets zurück.

Die hemmende Wirkung des Ornithins beruht schwerlich auf einer Umkehrung der Reaktion, wie Gross anzunehmen scheint; denn sowohl Edlbacher wie ich konnten unter geeigneten Bedingungen praktisch vollkommene Spaltung erreichen. Wahrscheinlicher ist, dass die Affinität der Arginase zum Ornithin die zum Arginin beträchtlich übertrifft. In diesem Falle sollte Steigerung der Argininkonzentration das Gleichgewicht der Zwischenverbindungen mit dem Enzym verschieben und dadurch die Spaltung begünstigen. Indessen zeigte ein Versuch nicht nur keine Änderung des Reaktionsverlaufes, sondern auch eine nur geringe Steigerung der absoluten Grösse des Umsatzes.

Erwähnt sei noch, dass die Schütz'sche Regel, die nach Arrhenius Ausdruck einer Hemmung durch die Spaltprodukte sein soll, deren Gültigkeit für enzymatische Reaktionen indessen fraglich ist[21], in beschränktem Maße erfüllt wird: Der Quotient aus Umsatz und Quadratwurzel der Zeit (nicht aber der Enzymmenge) ist einigermassen konstant.

Infolge des Fehlens einfacher kinetischer Gesetzmässigkeiten musste die Beziehung zwischen Enzymmenge und Umsatz nach dem Vorgang von Edlbacher empirisch festgelegt werden: Es wurde bestimmt, wieviel Harnstoff aus 100 mg Arginin in einer bestimmten Zeit (60 Min.) durch wechselnde Enzymmengen abgespalten wurde. (1 Arginase-Einheit nach Edlbacher legt unter diesen Bedingungen $^1/_{100}$ Millimol Harnstoff frei.)

2. Peptidase.

Die Bestimmung des Lebererepsins schloß sich der des Pankreas-[22] und Darmerepsins[23] an; als Substrat diente dl-Leucylglycin, gemessen wurde der Carboxylzuwachs durch alkoholische Titration[24].

Das Wirkungsoptimum fand ich zwichen p_H 7,7 und 8,3; auch

[22] E. Waldschmidt-Leitz u. A. Harteneck, Z. f. physiol. Chem. **147**, 286 (1925).

[23] E. Waldschmidt-Leitz u. A. Schäffner, Z. f. physiol. Chem. **151**, 31 (1925/26).

[24] R. Willstätter u. E. Waldschmidt-Leitz, Ber. **54**, 2988 (1921).

die Peptidasen von Pankreas[22], Darm[23], Hefe[25, 26], Niere[27], Milz[28] haben ihr Optimum zwischen p_H 7,8 und 8,0. Doch sind die Grenzen des Wirkungsbereiches, im Vergleich zum Darm- und Pankreaserepsin und zur Hefedipeptidase, stark gegen die alkalische Seite verschoben; überraschenderweise erwies sich die Wirksamkeit des Lebererepsins noch bei p_H 10,0 recht beträchtlich.

Der Reaktionsverlauf genügte wie bei anderen Peptidasen gut der monomolekularen Gleichung; die Umsätze waren für konstantes Produkt aus Enzymmenge und Zeit in weiteren Grenzen konstant, nur bei kleinen Enzymmengen und langen Zeiten blieben sie etwas zurück. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist also der Enzymmenge proportional. Daher konnte die monomolekulare Konstante als Maß der Enzymwirkung gewählt werden. (Der Gehalt der Bestimmungsprobe an Leber-Erepsin-Einheiten wurde also zahlenmässig der Reaktionskonstante gleichgesetzt.)

3. Protease.

Bei alkalischer Reaktion, etwa unter den Bedingungen der Trypsinwirkung, blieb der Extrakt ohne Wirkung auf Casein oder Gelatine. Die Protease wirkt vielmehr bei saurer Reaktion und dürfte dem Enzym in der Milz[28] und in der Niere[27] nahestehen, deren Optimum ebenfalls bei mässig saurer Reaktion liegt. Wie in der Milz tritt ihre Menge gegenüber der Peptidase zurück. War so eine Störung von Spezifitätsversuchen mit Arginase auch nicht zu erwarten, so wurde doch das Verhalten bei der Reinigung der Arginase verfolgt; gemessen wurde der NH_2-Zuwachs von Gelatine bei p_H 4,7.

II. Versuche zur Darstellung proteolytisch einheitlicher Arginase.

1. Adsorptionsmethoden.

Für die grossen Fortschritte, die unsere Kenntnis vom Enzymapparat des Tierkörpers und der Hefe besonders im letzten Jahr-

[25] K. G. Dernby, Biochem. Z. **81**, 107 u. zwar S. 179 (1917).
[26] R. Willstätter u. W. Grassmann, Z. f. physiol. Chem. **153**, 250 (1926).
[27] E. Waldschmidt-Leitz u. F. Dorfmüller (Privatmitteilung).
[28] E. Waldschmidt-Leitz u. W. Deutsch, Z. f. physiol. Chem. **167**, 285 (1927).

zehnt gemacht hat, aber auch für die Ausnützung dieser Erkenntnisse bei spezielleren präparativen oder analytischen Aufgaben war die Trennung der Enzyme von ihren Begleitstoffen und voneinander von größter Bedeutung. Eines der wichtigsten Hilfsmittel auf diesem Wege war die auswählende Adsorption an kolloide oder suspendierte Stoffe. Gerade für eiweißspaltende Fermente hat E. Brücke[29] dieses Verfahren zuerst bewußt angewandt, hier ermöglichte es S. G. Hedin[30] die erste Trennung verwandter enzymatischer Wirkungen und hier hat es, nachdem Michaelis auf die elektrochemische Natur des Vorgangs hingewiesen hatte, auch der Willstätter'schen Schule besondere Erfolge gebracht.

Die fraktionierte Adsorption war darum auch der gegebene Weg für die Darstellung enzymatisch reiner Arginase. Edlbacher und Simons[20] haben ihn benützt um die Verschiedenheit von Arginase und Histidase zu erweisen: Durch Voradsorption mit Tonerde und Elution des Adsorbats an Kaolin oder Tonerde mittels Glykokollpuffer von p_H 9 erhielten sie Arginaselösungen, die frei von Histidase waren und Gelatine nicht mehr angriffen.

Für die von mir angestrebte Abtrennung des Erepsins erwies sich das umgekehrte Verfahren als zweckmässig: nicht die Arginase durch Adsorption und Elution zu reinigen, sie vielmehr in der ursprünglichen Lösung von ihren Begleitern zu befreien. Es gelang nämlich, den größten Teil der Peptidase und Protease (neben einem Teil der Arginase) durch ein Adsorbens aufzunehmen und so der Lösung zu entziehen; die Arginase blieb dann in wesentlich reinerem Zustand in der Restlösung. Genügend auswählend wirkte Aluminiumhydroxyd, in der Modifikation C_γ[31], bei saurer Reaktion. Bei neutraler Reaktion adsorbierte es schwächer und weniger spezifisch; dasselbe galt für Kaolin bei saurer Reaktion, während dieser bei neutraler Reaktion Erepsin wie Arginase kaum adsorbierte. Umgekehrt verhielt sich Eisenhydroxyd, das bei saurer Reaktion beide Enzyme in fast gleichem Maße begierig der Lösung entzog.

[29] Sitzungsber. der math.-naturw. Kl. der K. Akad. d. W. Wien, **43**, 601 (1861).
[30] Biochemical Jl. **2**, 112 (1906).
[31] R. Willstätter, H. Kraut u. O. Erbacher, Ber. **58**, 2448 (1925).

An Tonerde C_γ in saurem Medium ist auch die Adsorption der Arginase beträchtlich, doch erlaubt ihr Ausmaß ein- bis zweimalige Wiederholung der Operation. So gelangte ich zu Restlösungen mit sehr geringem Erepsingehalt, beispielsweise $^1/_2$ bis 1 Prozent der ursprünglichen Menge; die Ausbeuten an Arginase waren für die weitere Verwendung durchaus befriedigend; sie lagen, natürlich ebenfalls von Extrakt zu Extrakt wechselnd, nach drei Adsorptionen bei 20 bis 30 Prozent der Ausgangsmenge und waren am selben Extrakt bei gleichen Adsorptionsvornahmen gut reproduzierbar. Bei größerer Verdünnung war die Adsorption stärker, das Verhältnis der Enzyme in der Restlösung blieb ähnlich.

Strengeren Anforderungen, die für Versuche mit längerer Arginaseeinwirkung zu stellen waren, genügte indessen die Abtrennung des Erepsins nur in günstigen Ausnahmefällen. In der Regel war seine adsorptive Entfernung über eine gewisse kleine Konzentration hinaus nur unter großen Verlusten an Arginase zu erreichen. Daher mußten andere Wege gesucht werden um die letzten Erepsinreste unwirksam zu machen.

Unbetriedigend blieben, wie erwähnt, Versuche aus den Adsorbaten reine Arginase freizulegen, namentlich gelang es nicht das Erepsin auswählend vorher herauszulösen. Die verschiedenartigen Elutionsversuche hatten stets ein ähnliches Ergebnis: Von der Arginase war selten mehr als ein Drittel wiederzugewinnen, dagegen errechneten sich an Erepsinausbeute zum Teil höhere Beträge, als der Restlösung entzogen worden war.

Es seien noch Methoden angeführt, bei denen das Adsorbens in der Lösung selbst erzeugt wird. Die Caseinfällung, wie sie zur Abtrennung der Enterokinase vom Trypsin dient[32], hatte nicht den gewünschten Erfolg; eine spezifische Affinität war ja nicht zu erwarten. Eine solche sollte das Erepsin zum Tyrosin besitzen, aber durch Ausfällung dieser Aminosäure ließ es sich gleichfalls nicht entfernen.

---

[32] E. Waldschmidt-Leitz u. K. Linderström-Lang, Z. f. physiol. Chem. **166**, 241 (1927).

Anhang: Fällung und Dialyse.

Einige andere Verfahren, die ebenfalls im wesentlichen auf dem Kolloidcharakter des Enzymkomplexes beruhen, brachten für die Gewinnung verwertbarer Arginaselösungen keinen Fortschritt; immerhin trugen sie zur allgemeinen Kennzeichnung des Enzyms bei.

In seinen gereinigten Lösungen bewirkte Säure (Salzsäure) keine Fällung. Von Schwermetallsalzen rief zehnprozentiges Bleiacetat nur eine geringe Trübung, dagegen Quecksilberchlorid eine gute Fällung hervor. Die Arginase ging dabei in den Niederschlag und ließ sich durch dessen Zerlegung mit Schwefelwasserstoff in mäßiger Ausbeute wiedergewinnen.

Ein Trockenpräparat wurde erhalten, wenn mit Aceton gefällt wurde, besser wenn mit Äther überschichtet und mittels Aceton Durchmischung bewirkt wurde. Die braune Fällung, in Wasser oder Glycerin unvollständig löslich, enthielt etwa ein Viertel der angewandten Arginase und merkliche Mengen Erepsin.

Bei zweitägiger Dialyse einer Adsorptionsrestlösung sank ihr Arginasegehalt auf weniger als die Hälfte, vielleicht im Zusammenhang mit der starken auftretenden Ausflockung.

2. Beständigkeit.

Die Beständigkeit von Enzymen gegen Hitze wie gegen Säure oder Alkali ist je nach der Natur und dem Zustand des Enzyms eine recht verschiedene; und in günstigen Fällen kann man mit Hilfe dieser Unterschiede ein Enzym von seinen Begleitern befreien. Ein solcher Fall lag aber bei der Leberarginase nicht vor: ihre Beständigkeit ist nicht besonders ungünstig, doch bei etwas stärkeren Eingriffen waren die Erepsinreste in den Adsorptionsrestlösungen stets resistenter als die Arginase.

Für wässerige Arginaselösungen hatte Hino[19] eine mit dem p_H rasch steigende Hitzeempfindlichkeit gefunden. Ich prüfte das Verhalten eines rohen Glycerinextraktes, der im allgemeinen sehr stabil ist, bei 65°: die wirksame Arginase sank rasch auf einen niedrigen Wert, das Erepsin folgte langsamer nach.

Der Einfluß der Acidität wurde in den Restlösungen der Tonerdeadsorption bei Eisschranktemperatur geprüft. Bei neutraler

Reaktion nimmt hier die Wirkung der Arginase erst nach einer Woche stärker ab und ebenso konstant bleibt der Erepsingehalt. Auch bei p_H 9,0 war die Arginase haltbar; für Erepsin ergab sich eine starke Vermehrung der Wirksamkeit, die vielleicht auf eine Neubildung oder Aktivierung des Enzyms in schwach alkalischem Medium zurückzuführen ist. (Dafür spricht auch das Verhalten bei der Elution mit Phosphat.) Bei p_H 10,5 war die Arginase schon viel empfindlicher als das Erepsin — stärkere Alkalität zerstört natürlich beide Enzyme rasch — und auch bei p_H 3,0 war das Erepsin etwas beständiger als die Arginase, die hier rasch verschwindet. Diese Säureempfindlichkeit der Arginase dürfte für manche andere Effekte nicht ohne Einfluß sein.

3. Hemmung, „Vergiftung".

Die neuere Enzymforschung neigt dazu für das Zustandekommen der Adsorption bestimmte chemische Affinitäten zwischen Enzym und Adsorbens verantwortlich zu machen, und in manchen Fällen, wie bei der Bindung der Lipase an Tristearin[33], kann darüber kein Zweifel bestehen. Aber ebenso sicher werden in nicht sehr reinen Lösungen die eigentlich chemischen Einflüsse überlagert und ausgeschaltet durch das elektro- und kolloidchemische Verhalten des ganzen Komplexes der gelösten Stoffe. In diesem Falle wirken die bisher besprochenen, mehr oder minder mit physikalischen Vorgängen verknüpften Methoden nicht spezifisch genug auf ein einzelnes Enzym und man wird mit rein chemischen Mitteln eindeutigere Wirkungen erzielen. Eine sicher chemische Reaktion des Enzyms selbst ist seine Einwirkung auf das Substrat. Zweifellos beruht diese Einwirkung fast immer auf der Bildung einer Verbindung irgendwelcher Art zwischen Enzym und Substrat, auch zwischen Enzym und Spaltprodukten. Man sucht die Affinität, die zu ihrer Bildung führt, auf ganz bestimmte Atomgruppierungen im Enzym- und im Substratmolekül zurückzuführen. Auf Grund dieser Überlegungen erkannte man in den Spaltprodukten Stoffe, die infolge ihres dem Substrat ähnlichen Baues das Enzym binden

[33] R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, Z. f. physiol. Chem. **125**, S. 120 und 184 f. (1922/23).

und dadurch an der Einwirkung auf das Substrat hindern können[34]. Weiterhin versuchte man auch die Anwendung andersartiger Stoffe, die mit der Affinitätsgruppe des Enzyms reagieren, sie dauernd oder reversibel besetzen, „vergiften" sollten[35]. Nach dem Gesagten kann man erwarten, dass die angewandten Stoffe unter Umständen durchaus spezifisch auf ein bestimmtes Enzym hemmend wirken.

Man hat so, zumal bei kinetisch übersichtlichen Vorgängen, sehr bemerkenswerte Vorstellungen über Reaktionsweise und chemischen Charakter von Enzymen entwickeln können, so K. Myrbäck[36] für die Saccharase, H. v. Euler und K. Josephson[37] für das Erepsin des Darms. Andererseits bot sich hier ein Weg, in Enzymgemischen ein Enzym unter Schonung eines anderen an der Wirksamkeit zu hindern, besonders in einem Falle wie dem vorliegenden, wo es sich darum handelt die kleinen Mengen eines Enzyms, zu deren Entfernung andere Methoden nicht ausreichen, unwirksam zu machen.

Als ein Stoff, der die Spaltung durch Erepsin hemmt, kam eine Aminosäure, wie das Glykokoll[38], in Frage; Glycylglycin wird in der Regel durch Peptidasen schwer gespalten*. Durch die von mir angewandten ziemlich geringen Mengen beider Stoffe konnte ich keine Hemmung des Lebererepsins beobachten.

Die Wirkung einiger, meist einfacher Stoffe auf Arginase hat Hino[19] untersucht: Bromid, Jodid, Cyanid, auch die Lipasegifte Chinin und Atoxyl waren ohne Einfluß, Fluorid hemmte schwach,

---

[34] V. Henri, Lois générales de l'action des diastases, Paris 1903. — L. Michaelis und M. L. Menten „Zur Kenntnis der Invertinwirkung", Biochem. Z. **49**, 333 (1913). — L. Michaelis und P. Rona, Biochem. Z. **60**, 62 (1914). — L. Michaelis und H. Pechstein, Biochem. Z. **60**, 79 (1914) (2 Arten der Hemmung).

[35] H. v. Euler und O. Svanberg, Z. f. physiol. Chem. **107**, 269 und zwar S. 300 (1919), Fermentforschung Bd. 3, 330 (1920) (Saccharase und Schwermetalle), Bd. 4, 29 (1920) (Aldehydreagenzien), Bd. 4, 142 (1920) (E.M.K. der Giftbindung).

[36] Z. f. physiol. Chem. **158**, 160, **159**, 1 (1926).

[37] Ber. **59**, 226 (1926), Z. f. physiol. Chem. **157**, 122 (1926); **162**, 85 (1926).

[38] v. Euler und Josephson, Z. f. physiol. Chem. **157**, 122 (1926).

* Allerdings wird das eher auf mangelnde Affinität als auf geringe Zerfallsgeschwindigkeit zurückgeführt (v. Euler und Josephson, Ber. **59**, 226 und zwar 230 [1926]).

Jod stark. Ich prüfte ein Schwermetallgift, Sublimat, und fand die Herabsetzung der Arginasewirkung beträchtlich, die des Erepsins unsicher; die auftretende Fällung macht die Verhältnisse unübersichtlich.

Nach Josephson und Euler[39] wird das Darmerepsin durch die typischen Aldehydreagenzien gehemmt. Das Lebererepsin meiner Lösungen zeigte ein weniger einheitliches Bild:

Gegen Phenylhydrazin war die Arginase viel empfindlicher als das Erepsin. Merkwürdigerweise war Sulfit fast wirkungslos, in einer Konzentration, die bei Euler[40] 50 Prozent Hemmung hervorrief.

Dagegen erwies sich, wie bei Hefe-[41] und Darmerepsin[39], als ausgesprochenes Peptidasegift die Blausäure. Ihr Einfluß zeigte deutliche Abhängigkeit von der Konzentration, etwas größere Mengen brachten die Wirkung der Erepsinreste völlig zum Verschwinden. Dagegen wurde die Arginase erst durch beträchtliche Cyanidmengen geschädigt und erholte sich wieder, wenn nach Zusatz des Giftes mit der Substratzugabe eine Zeitlang gewartet wurde.

Der Zusatz von Cyankalium zur Enzymlösung schien so ein geeignetes Mittel, bei der Prüfung der spezifischen Wirkungen der Arginase das Erepsin auszuschalten. Leider zeigten sich bei der Anwendung Unstimmigkeiten: Es wurde im Bestimmungsgang ein höherer Zuwachs an Ammoniak gefunden, als aus dem Arginin (in Form von Harnstoff) entstehen konnte. Die Ursache dieser Erscheinung ist nicht geklärt. Aus den Kontrollversuchen des experimentellen Teils ergibt sich jedenfalls, dass dieses Ammoniak dem Cyanid selbst entstammt und durch einen nicht enzymatischen Prozeß, jedoch unter Mitwirkung von Bestandteilen der Enzymlösung daraus gebildet wird. Der Effekt war weder der Cyanid-

[39] Josephson und v. Euler, Z. f. physiol. Chem. **162**, 85 (1926).

[40] Z. f. physiol. Chem. **162**, 85 u. zwar S. 93 (1926).

[41] K. G. Dernby, Biochem. Z. **81**, 107 u. zwar S. 192 (1917); nach W. Grassmann u. H. Dyckerhoff, Z. f. physiol. Chem., **179**, 41, giftig für Di- und Polypeptidase.

noch der Enzymlösungsmenge proportional; der Fehler* ließ sich daher aus den Ergebnissen nur schätzungsweise eliminieren.

Ich suchte die Blausäure durch eine Substanz zu ersetzen, die in manchen physiologischen Wirkungen sich ähnlich verhält: durch Schwefelwasserstoff. In der Tat bewirkte ein Zusatz von Schwefelnatrium fast die gleiche durchgreifende Hemmung des Erepsins. (Grassmann und Dyckerhoff[42] fanden die Di- und die Polypeptidase der Hefe ebenfalls durch Sulfid hemmbar.) Die Arginase wurde nicht beeinträchtigt, auch sonst traten keine Störungen auf; insbesondere verlief die Spaltung von Arginin vollständig, so dass der Verwendung von Sulfid bei quantitativen Arginaseversuchen mit erepsinempfindlichen Substraten nichts im Wege stehen dürfte.

Es ist also durch Verknüpfung zweier Methoden gelungen, Lösungen mit den Wirkungen proteolytisch einheitlicher Arginase zu gewinnen: Die Hauptmenge des Erepsins und der — bei alkalischer Reaktion nicht wirksamen — Protease wurde durch Adsorption an Tonerde in saurem Medium entfernt, die noch vorhandenen Erepsinreste machte ein Zusatz eines „Giftes“ (Schwefelnatrium) unwirksam.

III. Zur Spezifität der Arginase.

Die Untersuchungen über die Arginase aus der Leber, die zunächst vorwiegend von Fragen des Stoffwechsels ausgingen, zeigten bald, dass dieses Enzym einfache Guanidinabkömmlinge, auch Guanidocarbonsäuren, nicht zu spalten vermag, und neuere Untersuchungen bestätigten diesen Befund. Man prüfte nämlich ohne eine Spaltung zu beobachten: Guanidin, Triphenylguanidin (H. D. Dakin[43]); Guanidoessigsäure (= Glykocyamin) (Dakin[43], Edlbacher[4])* und ihr Methylderivat Kreatin und Kreatinin (Dakin[43]),

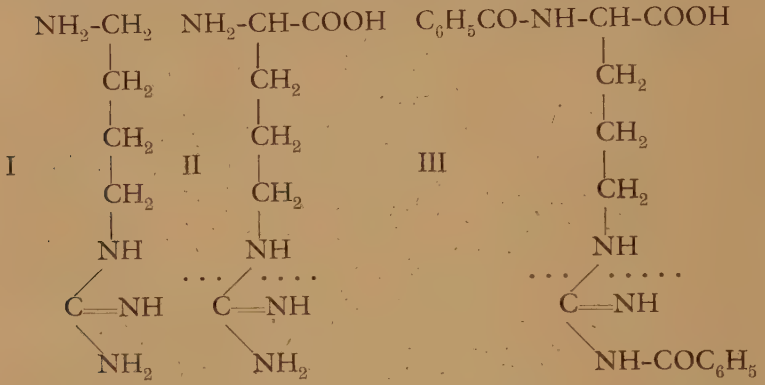
* (er betrug je nach den Versuchsbedingungen bis zu 5 Prozent des Gesamtarginins.)

[42] Z. f. physiol. Chem., **179**, 41.

[43] Jl. of. Biol. Chem. **3**, 435 (1907).

* Ob die von J. Karashima (Z. f. physiol. Chem. **177**, 42 [1928]) beobachtete Bildung von Harnstoff und Glykokoll der Arginase zuzuschreiben ist, erscheint recht zweifelhaft.

α-Guanidopropionsäure (Edlbacher[4]), γ-Guanidylbuttersäure (K. Thomas[44]), ε-Guanidyl-n-capronsäure (Thomas[45]).



Aber auch das Agmatin (δ-Amino-tetramethylen-guanidin) (Formel I), das sich vom Arginin (II) nur durch das Fehlen der Carboxylgruppe und damit der optischen Aktivität unterscheidet, wird nicht angegriffen (Edlbacher[4]). Auch pflanzliche Arginase verschiedener Herkunft vermag das Agmatin nicht zu spalten (A. Kiesel[46]), und die Umwandlung von Tetramethylen-diguanidin in Agmatin konnte Kiesel nur durch Aspergillus niger beobachten. Ureide werden nicht angegriffen (H. Bierry und A. Ranc[47]).

So wie zahlreiche Enzyme nur den natürlich vorkommenden optischen Antipoden anzugreifen vermögen, zerlegt auch die Arginase nur das d-Arginin (O. Riesser[48], Edlbacher[4]). Verschwindet auch das l-Arginin, wie bei der Leberdurchblutung (K. Felix und K. Morinaka[49]) oder durch lebende Bakterien (A. Kossel und F. Curtius[50]), so gilt das als Zeichen dafür, dass andersartige Vorgänge wirksam sind.

[44] Z. f. physiol. Chem. **124**, 75 u. zwar S. 101 (1923).
[45] Z. f. physiol. Chem. **88**, 465 (1913).
[46] Z. f. physiol. Chem. **118**, 284 (1922).
[47] C. r. soc. biol. **67**, 184 (1909) (zitiert nach Kiesel, loc. cit.).
[48] Z. f. physiol. Chem. **49**, 210 (1906).
[49] Z. f. physiol. Chem. **132**, 152 (1923/24).
[50] Z. f. physiol. Chem. **148**, 283 (1925).

Aus diesen Ergebnissen ging schon hervor, dass mehrere Faktoren zusammenwirken müssen, um den Angriff der Arginase am d-Arginin zu ermöglichen. Es ist nun sehr beachtenswert, dass nach H. Steib[51] das nächsthöhere Homologe des Arginins, die ε-Guanido-α-amino-n-capronsäure nicht spaltbar ist. Also ist die Länge der Kette von Bedeutung. Die weiteren Kennzeichen des Arginins sind: die Carboxylgruppe, die α-Aminogruppe, die endständige Guanidingruppe. Die Carboxylgruppe hält Edlbacher[4] für notwendig, da nicht nur das Agmatin unspaltbar ist, sondern auch der (leicht verseifbare) Argininmethylester nicht gespalten werden soll.

Um den Einfluß von Substituenten an der Guanidin- und Aminogruppe zu prüfen, untersuchte ich zunächst das d-Dibenzoylarginin, aus dem Benzoylharnstoff und α-Benzoylornithin entstehen müßte[52] (III). Eine Spaltung der Substanz trat nicht ein. Zu dem gleichen negativen Befund kamen kürzlich K. Felix, H. Müller und K. Dirr[53].

Ebensowenig spaltbar waren Verbindungen, die nur am Guanidin substituiert sind: d-Nitroarginin (Felix und Mitarbeiter[53]), δ-N-Methylarginin (K. Thomas, J. Kapfhammer und B. Flaschenträger[54]) und schließlich die Argininphosphorsäure, die nach Meyerhof und Lohmann[3] analog der Kreatinphosphorsäure[55] als Guanidinoderivat zu betrachten ist (die α-Aminogruppe liegt frei).

Übrigens scheint dieser Punkt weniger bedeutsam für die Eiweißchemie, da nach allgemeiner Auffassung die Guanidingruppe des Arginins wenigstens in einfacheren Eiweißkörpern stets frei liegt. Um so mehr interessiert, besonders für die Chemie der Protamine, der Einfluß von Veränderungen an der Aminogruppe.

[51] Z. f. physiol. Chem. **155**, 301 (1926).

[52] K. Felix und K. Dirr, Z. f. physiol. Chem. **176**, 29 (1928).

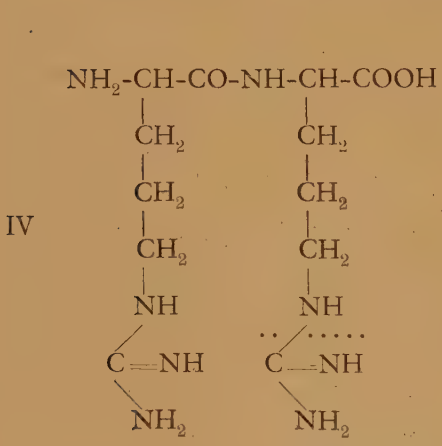
[53] nach freundlicher Mitteilung [Z. f. physiol. Chem. **178**, 192 (1928).]

[54] Z. f. physiol. Chem. **124**, 75 (1923).

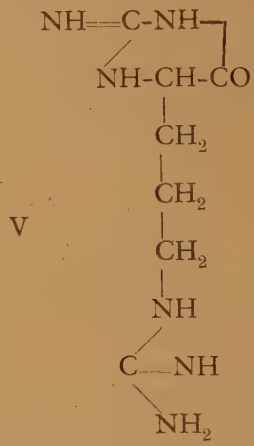
[55] C. H. Fiske und J. Subbarow, Science **65**, 401 (1927); O. Meyerhof und K. Lohmann, Naturw. **15**, 670 und 768 (1927); K. Lohmann, Biochem. Z. **194**, 306 (1928).

Auch hier liegen schon einige negative Befunde vor: für die Argininsäure, in der die Aminogruppe des Arginins durch Hydroxyl ersetzt ist (Felix[53]), und für das dl-α-N-Methylarginin (Steib[56]). Aber ein anderes Bild erhielt Felix[53], wenn der Substituent ein Säurerest war: das Monobenzoyl-arginin wurde gespalten, nicht beim erwarteten p_H 9,0, sondern zwischen p_H 6,5 und 7,5; eine Abspaltung des Benzoylrestes soll dabei nicht im Spiele sein.

Wie steht es nun bei Einführung eines Aminosäurerestes, bei den Peptiden? Edlbacher und Bonem[4] glaubten die Frage in positivem Sinne gelöst zu haben: Das Arginyl-arginin aus dem Pikrat nach E. Fischer und U. Suzuki[57], für das sie die Formel IV



IV



V

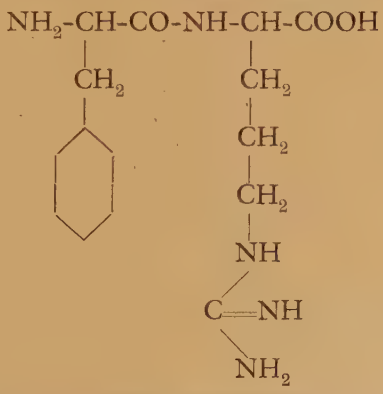
als erwiesen annahmen, gab annähernd ein Viertel seines Gesamtstickstoffs als Harnstoff ab, und sie vermuteten auf Grund ihrer Theorie über die Notwendigkeit der Carboxylgruppe, es sei die Molekülhälfte mit der freien Carboxylgruppe angegriffen worden. Aber L. Zervas und M. Bergmann[58] haben gezeigt, dass das „Arginylarginin" im Nitrat von Fischer und Suzuki in Wirklichkeit razemisches α,δ-Bisguanido-n-valeriansäure-anhydrid (V) ist. Diese Verbindung besitzt zwar keine freie Carboxylgruppe

[56] Z. f. physiol. Chem. **155**, 279 (1926).
[57] Ber. **38**, 4186 (1905).
[58] Ber. **61**, 1195 (1928).

doch schien mir ihre Prüfung mit Arginase geboten und nicht ohne Interesse. Ich stellte also den Körper nach der Vorschrift von Zervas und Bergmann über das Pikrat dar und erhielt das Nitrat mit den dort geforderten Eigenschaften. Bei der Einwirkung gereinigter Arginase bei p_H 9 trat ein nur geringer Ausschlag ein (1,3 Prozent des Gesamtstickstoffs oder $7^1/_2$ Prozent der Theorie, wenn man Spaltung nur einer Guanidogruppe und nur eines optischen Antipoden erwartet) und auch dieser war sicher nur zum Teil enzymatischer Natur. Als spezifisches Substrat der Arginase kann das „Arginylarginin" demnach nicht gelten. (Edlbachers abweichendes Ergebnis wäre am einfachsten zu erklären durch die hartnäckige Verunreinigung des Fischerschen Pikrats mit Arginin[58]; doch erscheint es nach seinen auffallenden Befunden über Zunahme des Formolstickstoffs bei der Hydrolyse wohl möglich, dass sein Präparat daneben ein Peptid enthielt[59].)

An synthetischen Argininpeptiden ist danach nur das d-Phenylalanyl-d-arginin (VI) von M. Bergmann und H. Köster bekannt[60]. Dank dem freundlichen Entgegenkommen von Professor Bergmann konnte ich eine kleine Menge des Originalpräparats auf ihr Verhalten gegen Arginase prüfen. Der Versuch wurde bei p_H 8,7 angestellt; Erepsinwirkung war durch Sulfidzusatz ausgeschaltet, zur Schonung des Substrats wurde kurze Versuchszeit,

VI



[59] vgl. A. Kossel und W. Staudt, Z. f. physiol. Chem. **170**, 91 (1927).
[60] Z. f. physiol. Chem. **167**, 91 (1927).

dafür eine Enzymmenge angewandt, die im Parallelversuch ein Mehrfaches der äquivalenten Argininmenge quantitativ zerlegte. Es ergab sich, dass das Peptid durch die Arginase nicht gespalten wurde.

Es mag verfrüht sein aus diesem Einzelresultat weitgehende Schlüsse zu ziehen. Zur Vorsicht mahnt Felix' merkwürdiges, allerdings auch vereinzeltes Ergebnis beim Monobenzoylarginin; und vor allem fehlt jedes synthetische Beispiel für die Arginylargininpeptide, die Kossel mit großer Bestimmtheit als Bausteine der Protamine annimmt[59]. Trotzdem möchte ich der Annahme zuneigen, dass sich die Wirkung der Arginase auf das freie d-Arginin beschränkt. Zum mindesten aber ist beim p_H-Optimum der Argininspaltung eine nennenswerte Zerlegung von Argininpeptiden sehr unwahrscheinlich, so dass die Arginase in Verdauungsgemischen tatsächlich nur freies Arginin anzeigen dürfte. Diesem Bilde scheint sich das Ergebnis des folgenden Abschnitts gut einzufügen.

IV. Versuche mit Verdauungsprodukten der Protamine.

Die Protamine selbst werden, wie Kossel und Dakin angeben[11] und wie sich in meinen Versuchen bestätigte, von Arginase nicht angegriffen. Bei ihrer Verdauung durch einheitliche proteolytische Enzyme werden auf den einzelnen Stufen definierte Mengen an Peptiden und Aminosäuren, also vor allem an Arginin, freigelegt. Die präparative Trennung dieser Gemische ist nicht einfach, daher war es wertvoll durch Einwirkung proteolytisch einheitlicher Arginaselösung zu Aussagen über die Menge des freien Arginins zu gelangen. Die Versuche wurden nach der Blausäuremethode ausgeführt und mußten aus äußeren Gründen leider vorzeitig abgebrochen werden. Gleichwohl gestatten die Ergebnisse einige wichtige Angaben zur Kennzeichnung der Verdauungsprodukte und werfen von einer neuen Seite Licht auf die Spezifität proteolytischer Enzyme.

Papain-Blausäure legte aus Salmin kein Arginasesubstrat frei; ebenso erhöhte sich die Menge spaltbaren Arginins nicht, wenn dieses Enzym auf das Produkt der Verdauung durch Trypsin ein-

wirkte. Damit unterscheidet sich die Papainwirkung grundsätzlich von der des Trypsins, obwohl für den Carboxylzuwachs ähnliche Werte gefunden werden. Denn inaktives Trypsin bildet beträchtliche Mengen Arginasesubstrat, sowohl aus dem unveränderten Salmin wie (wahrscheinlich in größerer Menge) nach vorheriger Einwirkung von Papain-Blausäure. Dass durch Einwirkung von Trypsin-Kinase (die zahlreiche Peptidbindungen löst) auf die genannten Verdauungsprodukte die Hauptmenge des Arginins spaltbar wurde, war nicht überraschend. Dagegen verdient besondere Beachtung, dass im Verdauungsprodukt des Clupeins durch inaktives Trypsin 21 Prozent des Gesamtarginins in spaltbarer Form gefunden wurde und dass E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner[61] dieselbe Menge präparativ als freies Arginin isolieren konnten. Das scheint einen Schlüssel für die Auswertung der übrigen Resultate zu geben und eine wichtige Stütze für die Auffassung, dass die Arginase nur das freie d-Arginin zu spalten vermag.

[61] Privatmitteilung.

Experimenteller Teil.

Enzymmaterial.

Als Ausgangsmaterial dienten Glycerinextrakte aus frischer Schweinsleber, ähnlich gewonnen wie bei der Milz[28]: Die ganz frische, in der Fleischmaschine zerkleinerte Leber wurde mit 87 prozentigem Glycerin (3 ccm für 1 g) angeschüttelt und nach einigen Stunden zu tagelanger Filtration aufs Faltenfilter gegossen. Langsame Filtration schien die Ausbeute an Arginase, vielleicht auch an Begleitenzymen, zu erhöhen. Die tiefgefärbten Extrakte waren viele Monate haltbar, wurden daher meist gealtert verwendet.

Den Extrakt aus getrockneter Drüse darzustellen erwies sich hinsichtlich der Enzymausbeute und des Adsorptionsverhaltens (s.d.) nicht als vorteilhaft. (Die unter Acetonzusatz ganz frisch zerkleinerte Leber wurde dreimal mit dem Doppelten ihres Volumens an Aceton, zweimal mit Aceton-Äther 1:1, dreimal mit Äther entwässert, das gesiebte Pulver, etwa $^1/_5$ des Frischgewichtes, mit Glycerin, 10 ccm pro Gramm, angeschüttelt und nach einigen Stunden filtriert. Die Filtration verlief wesentlich rascher.)

I. Die Bestimmung der Enzyme.

1. Die Bestimmung der Arginase

folgte im wesentlichen der Vorschrift von Edlbacher und Röthler[15]; ihr Gang war zumeist dieser:

Zu 10 ccm einer 1 prozentigen Lösung von Arginin als Carbonat und 5 ccm n/10 Glykokoll-NaCl-NaOH-Puffer von p_H 9,5 (nebst der erforderlichen Menge Säure oder Lauge) wurde das Enzym zugefügt, der Ansatz zu 20 ccm aufgefüllt und unter Toluol bei 37°* belassen; nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Enzym-

* Die Versuchstemperatur betrug bei allen in dieser Arbeit untersuchten Arginasewirkungen 37°.

wirkung durch Umstellen auf p_H 3 scharf abgebrochen und 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde auf p_H 7,0 gebracht und 2 ccm m/3 Phosphatpuffer vom gleichen p_H, dann Ureasepulver (s. u.) zugefügt. Nach 60 Min. Verweilen bei 37° wurde mit 1 bis 2 ccm 25 prozentiger Natronlauge alkalisch gemacht, Oktylalkohol zugegeben und das gebildete Ammoniak während 4 bis 5 Stunden bei Zimmertemperatur durch einen kräftigen Luftstrom in zwei Vorlagen (nach Folin[16]) mit n/50 Schwefelsäure getrieben und gegen Methylrot zurücktitriert. (100 Prozent Spaltung von 100,0 mg Arginin entspricht ein Verbrauch von 57,43 ccm n/50 H_2SO_4.) Der Leerverbrauch von Enzymlösung usw. wurde natürlich, wenn nötig von Fall zu Fall, bestimmt.

Anm. Die letzten 1 bis 2 % Ammoniak gehen sehr schwer über, doch schien Erwärmen bei empfindlicheren Substraten gewagt. Als Urease verwendete ich 100 mg gemahlene und entfettete Sojabohnen, in einigen Fällen 150 mg „Sojabohnenmehl präpariert" von Merck, das sich als wirksamer erwies:

In 60 Min. zerlegten

100 mg Sojabohnen		16,6 mg Harnstoff zu	99,2 %
100 „ „		16,6 „ „ „	99,9 %
100 „ „ ,	älter	17,8 „ „ „	98,5 %
30 „ „ ,	„	17,6 „ „ „	75,0 %;

in Gegenwart von Sulfid (s. dort):

30 mg Sojabohnen,	älter	17,6 mg Harnstoff zu	61,5 %
30 „ Präparat v. Merck		17,0 „ „ „	96,4 %
150 „ „ „	„	17,0 „ „ „	97,9 %

Der geringe Fehlbetrag dürfte im wesentlichen auf die Destillation entfallen.

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Wirkung vom p_H wurden Spaltungen in der Gegend von 30 Prozent gewählt, da größere Spaltungen im allgemeinen kein klares Bild geben. Der erste Versuch der Tabelle 1 zeigt, unter Verwendung von Puffergemischen mit wechselnder Glykokollmenge, die ungefähre Lage des Optimums, zwischen p_H 9,4 und 9,8; der zweite maß unter Konstanthaltung der Glykokollkonzentration den genaueren Gang der p_H-Abhängigkeit und schloß das Wirkungsoptimum in engere Grenzen (p_H 9,5 bis 9,7) ein (Figur 1). Auf Grund dieses Ergebnisses behielt ich für Arginasebestimmungen das p_H 9,5 der ursprünglichen Angabe von Edlbacher bei, während für Spezifitäts-

versuche an empfindlicheren Substraten weniger alkalische Reaktion, etwa p_H 8,5 bis 9,0, vorgezogen wurde.

Figur 1.

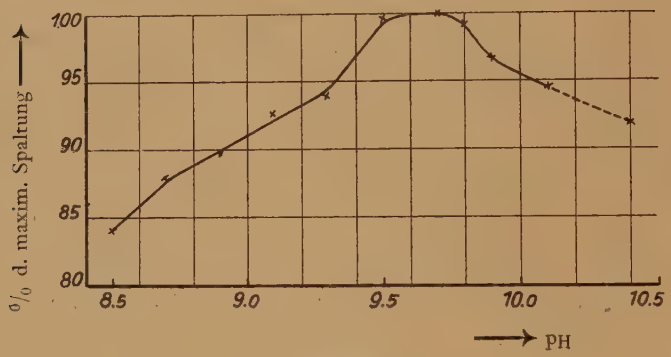


Tabelle 1.

pH-Optimum der Arginasewirkung.

Versuch 1: In 20 ccm Ansatz 0,100 g Arginin als Carbonat, Säure oder Lauge nach Bedarf, 5 ccm n/10 Glykokoll-Puffer vom gewünschten pH; 0,80 ccm des aufs 10-fache verdünnten Rohextrakts. Versuchszeit 60 Min. Nach dem Versuch bestand noch das gewünschte pH.

pH	9,0	9,4	9,8	10,4
Spaltung ccm n/50 NH_3	16,47	17,15	17,64	16,55
„ % vom Arginin	28,7	29,9	30,7	28,8

Versuch 2: Genauere pH-Abhängigkeit.

In 26 ccm Ansatz 0,100 g Arginin als Carbonat, 10,0 ccm n/10 Glykokoll-NaCl-Lösung; 1,00 ccm des aufs 10-fache verdünnten Rohextrakts; die benötigte Menge Säure oder Lauge wurde in Vorversuchen sorgfältig kolorimetrisch ermittelt. 60 Min.

pH	8,5	8,7	8,9	9,1	9,3	9,5	9,7	9,8	9,9	10,1
Spaltung % vom Arginin	25,1	26,3	26,9	27,8	28,1	29,9	30,0	29,7	29,0	28,3
% der Maximalspaltung	83,9	87,8	89,7	92,7	94,1	99,7	100,0	99,2	96,8	94,7

Den Reaktionsverlauf der Argininspaltung beim Optimum untersuchte ich in der Hoffnung eine für die Enzymbestimmung

brauchbare Gesetzmäßigkeit aufzufinden. Bei großen wie bei kleinen Spaltungsgraden bestätigte sich der Befund von Gross[14], dass die Werte für den Ausdruck $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ im Laufe eines Versuchs stets fallen (Tabelle 2). Dagegen schien es, als werde die Beziehung „$E \cdot t =$ konstant“ im Bereich kleiner Spaltungen erfüllt. Aber es zeigte sich, dass nur im ungünstig zu messenden ersten Stadium der Reaktion sich die Umsätze etwa umgekehrt wie die angewandten Enzymmengen verhielten; in längeren Versuchszeiten versagte die Beziehung namentlich bei stärkeren Unterschieden der verglichenen Enzymmengen stets, auch für Spaltungen weit unter 20 Prozent (Tabelle 3).

Tabelle 2.

Verlauf der Argininspaltung.

In den Versuchen der Tabellen 2 bis 4 enthielten 20 ccm vom pH 9,5 100 mg Arginin und 5 ccm Glykokollpuffer; die ccm Enzymmenge bedeuten das Volumen des Extrakts nach Verdünnung auf das 10-fache und Klärung durch Zentrifugieren.

E (ccm)	2,0					0,125		
Minuten	15	30	60	90	120	20	40	80
Spaltung %	20,7	37,8	56,6	63,4	70,5	2,6	4,8	8,2
k	0,00671	—687	—604	—485	—442	0,00056	—53	—46

Tabelle 3.

Abhängigkeit des Umsatzes von der Enzymmenge.

Reihe a für größere, b bis d für kleinere Spaltungen. E in ccm, t in Min.

Reihe a.

Enzymmenge E (ccm)	E · t = 30	60	120	180	240
	% Spaltung				
0,50	22,5	31,1	46,5	53,6	60,2
1,00	23,4	34,2	49,7	60,9	67,0
2,00	20,7	37,8	56,6	63,4	70,5

Reihe b.

E	E · t = 10	20	30
	% Spaltung		
0,50	12,0	17,9	24,2
0,25	12,2	18,2	22,2
0,125	10,8	16,7	19,6

Reihe c.

E	E · t = 2,5	5	10
	% Spaltung		
0,125	2,6	4,8	8,2
0,062	2,4	4,8	7,2

Reihe d.

E	E · t = 2,5	5	10
	% Spaltung		
0,25	2,7	5,6	8,5
0,031	2,2	3,7	5,8

Der Reaktionsverlauf wurde nicht geändert durch Zusatz einer größeren Menge Glycerin; seine Wirkung beschränkte sich auf eine mäßige Hemmung (Tabelle 4). Auch durch Steigerung der Argininkonzentration auf das Fünffache der gewöhnlichen (bei Anwendung kleiner Enzymmengen) wurde weder monomolekularer Verlauf noch Gültigkeit der „E · t-Beziehung“ erreicht; aber auch die absolute Menge des gebildeten Harnstoffs wurde nicht wesentlich erhöht (Tabelle 5).

Tabelle 4.

Einfluß höherer Glycerinkonzentration.

Versuch a enthielt die gewöhnliche, sehr geringe Menge Glycerin (ca. 0,35 %), Versuch b 8,7 % Glycerin.

Minuten	a) 0,35 % Glycerin		b) 8,7 % Glycerin	
	Spaltung %	k	Spaltung %	k
30	23,4	0,00386	21,9	0,00358
60	34,2	303	31,0	269
120	49,7	244	44,9	216
180	60,9	226	54,1	188

Tabelle 5.

Einfluß erhöhter Argininkonzentration (bei kleinen Umsätzen). In 20 ccm Ansatz a) 100, b) 500 mg Arginin (als Carbonat), sonst wie Tabelle 2.

Arginin mg	E (ccm)	0,25			0,031		
	Minuten	10	20	40	80	160	320
a) 100	Spltg. ccm n/50 NH_3	1,85	3,49	5,18	1,54	2,40	3,59
	k	0,00119	—125	—096	0,00012	—10	—08
b) 500	Spltg. ccm	2,13	4,07	5,79	1,57	2,66	4,42
	k	0,00032	—28	—22	0,000040	—23	—22

Das Zurückbleiben der Umsätze durch die kleinere Enzymmenge äußert sich auch, wenn man die Schütz'sche Regel anzuwenden sucht. Diese wird ausgedrückt durch die Gleichungen $x = q \cdot \sqrt{E}$ für konstantes t; $x = p \cdot \sqrt{t}$ für konstantes E (E bedeutet die Enzymmenge, t die Zeit, x den Umsatz). p und q sollen konstant sein. Tatsächlich nimmt in meinen Versuchen $q = \frac{x}{\sqrt{E}}$ mit der Enzymmenge ab (Beispiel: für E = 2,0; 1,0; 0,50; 0,25 und 60 Min. ist q = 40,0; 34,2; 33,0; 32,6); dagegen bleibt $p = \frac{x}{\sqrt{t}}$ im einzelnen Versuch in gewissen Grenzen konstant, am besten bei höherer Glycerinkonzentration (p = 4,00; 4,00; 4,10; 4,03 für 30 bis 180 Min.); ein zeitlicher Gang (Zu-, dann Abnahme) ist deutlich (z. B. für E = 0,50 und 120 bis 480 Min. war p = 2,84; 3,00; 2,83; 2,75). Ähnliche Zahlen lassen sich übrigens aus den Versuchsreihen von Edlbacher und Bonem[4] errechnen, nur sind die Abweichungen von der Regel, wohl wegen der großen Versuchszeiten und Spaltungsgrade, beträchtlicher.

Da sich auf den Reaktionsverlauf eine Bestimmungsmethode nicht gründen ließ wurde die Beziehung zwischen Enzymmenge und Umsatz während einer festen Bestimmungszeit ermittelt, zunächst für 30 Min. Die erhaltene Eichkurve (Figur 2 b, s. S. 34) entsprach im Verlauf ganz der von Edlbacher und Röthler[15] veröffentlichten, daher wurde die von ihnen festgesetzte Versuchszeit von

60 Min. (Tabelle 6; Figur 2 a, S. 33) und ihre Definition der Arginase-Einheit in folgender Form übernommen:

1 Arginase-Einheit (A.-E.) ist jene Enzymmenge, die aus 100 mg Arginin (als Carbonat) in Gegenwart von 5 ccm n/10 Glykokollpuffer im Gesamtvolumen von 20 ccm bei p_H 9,5 und 37° in 60 Min. eine Menge Harnstoff abspaltet, die 0,34 mg NH_3 entsprechend 1,00 ccm n/ 50 H_2SO_4 liefert.

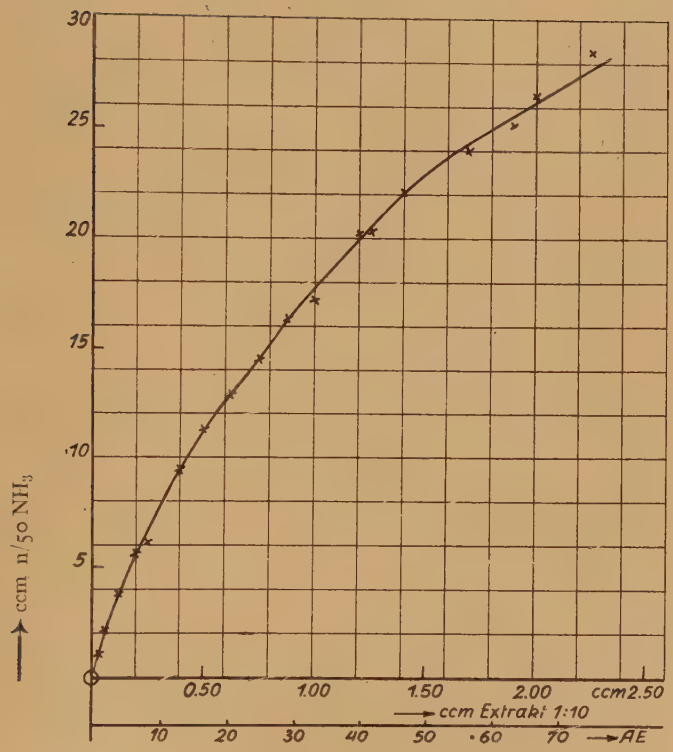
Tabelle 6.

Eichkurve für Arginase.

Rohextrakt wurde aufs 10-fache verdünnt und durch Zentrifugieren geklärt; für ganz kleine Enzymmengen wurde diese Lösung natürlich weiter verdünnt.

ccm Extrakt 1 : 10	In 30 Minuten		In 60 Minuten		A.-E.
	ccm n/50 NH_3	% vom Arginin	ccm n/50 NH_3	% vom Arginin	
0,031	—	—	1,01	1,7	1,0
0,063	1,17	2,0	2,14	3,7	2,1
0,125	1,88	3,3	3,93	6,8	4,1
0,20	—	—	5,61	9,8	6,6
0,25	3,85	6,7	6,15	10,7	8,3
0,40	—	—	9,44	16,4	13,2
0,50	6,90	12,0	11,28	19,6	16,5
0,62	—	—	12,86	22,4	20,5
0,75	9,78	17,0	14,52	25,3	24,8
0,87	—	—	16,14	28,1	28,7
1,00	11,62	20,2	17,09	31,3	33,0
1,20	—	—	20,16	35,1	39,6
1,25	13,79	24,0	20,38	35,5	41,3
1,40	—	—	22,12	38,5	46,2
1,50	15,01	26,1	—	—	49,5
1,70	—	—	24,01	41,8	56,1
1,75	16,91	29,5	—	—	57,8
1,90	—	—	25,21	43,9	62,7
2,00	18,50	32,2	26,51	46,2	66,0
2,25	—	—	28,55	49,7	74,3
2,50	21,22	37,0	—	—	82,5
3,00	23,24	40,5	—	—	99,0
3,80	26,69	46,5	—	—	125,4
4,50	29,68	51,7	—	—	148,5

Figur 2 a.



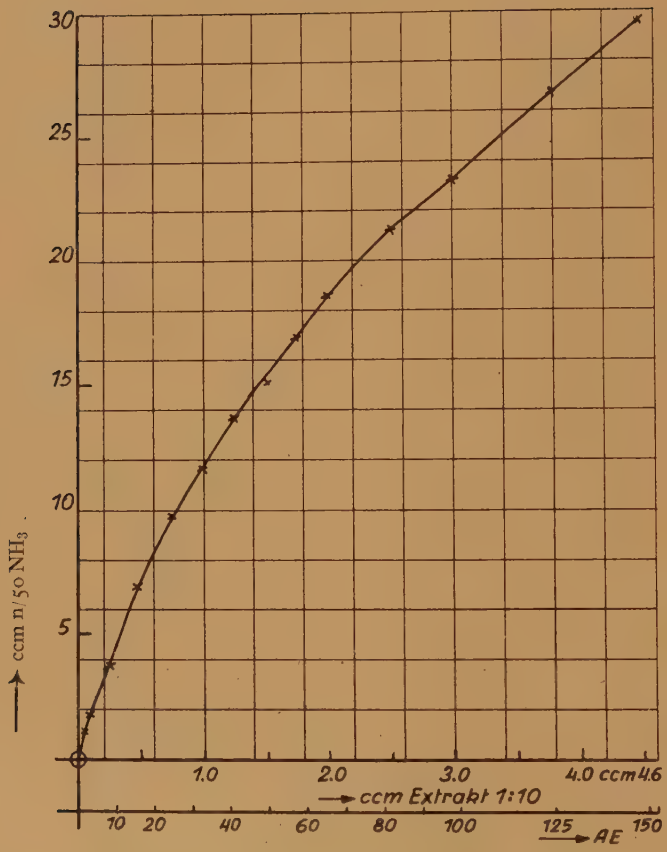
Versuchszeit 60 Minuten.

In den Versuchen der Tabelle 6 entsprach 1 ccm des aufs Zehnfache verdünnten Extraktes (I) ungefähr 33 dieser (recht kleinen) Einheiten. Die Tabelle, wie auch die Figur 2, zeigt übrigens gut, dass für konstantes E · t der kleineren Enzymmenge oder der größeren Versuchszeit ein kleinerer Umsatz entspricht.

2. Die Bestimmung des Lebererepsins.

Gemessen wurde der Carboxylzuwachs von dl-Leucylglycin durch Titration mit n/5 alkoholischer Kalilauge und Thymolphtalein in 90prozentigem Alkohol[24]; die Bestimmungseinheit enthielt 0,1882 g = 1 Millimol des Peptids, in der Regel in 10 ccm Gesamtvolumen

Figur 2 b.



Versuchszeit **30** Minuten.

(entspr. m/10 Leucylglycin); die Versuchstemperatur war die für tierische Proteasen übliche von 30°.

Zur Bestimmung der p_H-Abhängigkeit wurde m/3 Phosphat-Citratpuffer nach R. Willstätter und W. Grassmann[26] verwandt (enthaltend 22,6 g KH_2PO_4 und 35,7 g Zitronensäure-Monohydrat in 500 ccm), dessen p_H sich mittels Ammoniak in weiten Grenzen variieren lässt (Tabelle 7 a). Die Wirksamkeit des Leber-erepsins zeigte sich erst bei p_H 7,0 merklich, erreichte ihr Maxi-

mum bei p_H 8,0 und nahm dann langsam ab. Für das Gebiet des Optimums der Arginase ergab sich (Tabelle 7b), unter Verwendung von Ammoniak-Ammonchloridpuffer, noch eine sehr beträchtliche Wirksamkeit der Peptidase, über die Hälfte der maximalen. Stärkere Wirkung jenseits p_H 8,5 wurde weder am Pankreas- und Darmerepsin noch an der Dipeptidase der Hefe beobachtet, nur an der Milzpeptidase (Tabelle 7c, Figur 3).

Zur Prüfung der Reaktionskinetik und dementsprechend für die Enzymbestimmungen verwendete ich einen Phosphat-Ammoniakpuffer von p_H 8,0. (Das Peptid wurde unter Zusatz von 0,82 ccm

Tabelle 7 a.

p_H-Abhängigkeit der Wirkung der Leberpeptidase.

15 ccm enthielten 0,188 g Leucylglycin, gelöst unter Zugabe von 1,5 ccm m/3 Phosphat-Citratpuffer; Einstellung des p_H mit 2,5 n-NH_3; 0,30 ccm Rohextrakt (vor Zugabe verdünnt); 60 Min.

p_H	5,0	6,0	7,0	7,3	7,7	8,0	8,4	8,9
Aciditätszuwachs ccm n/5 KOH	0,06	0,06	0,44	0,86	1,01	1,04	0,98	0,60
= % von 2,50 ccm	(2)	(2)	18	34	40	42	39	24
% der max. Spalt.	(6)	(6)	42	83	97	100	94	58

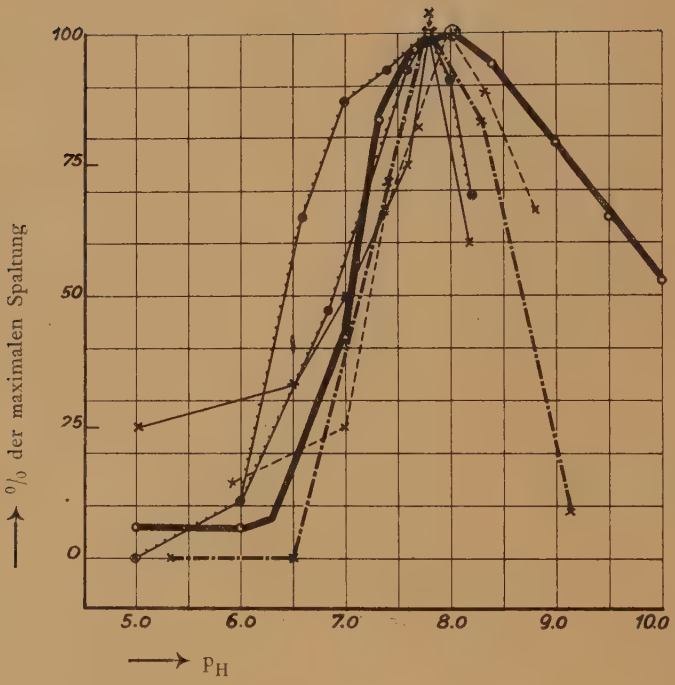
Tabelle 7 b.

Erepsinwirkung im p_H-Bereich optimaler Argininspaltung.

10 ccm enthielten 0,167 g (8/9 der üblichen Menge) Leucylglycin, die nötige Menge NaOH, 1,8 ccm n/1-NH_3-NH_4Cl-Puffer vom gewünschten pH; 0,45 ccm Rohextrakt; 60 Min.

p_H	8,0	9,0	9,5	10,0
Zuwachs in ccm n/5 KOH:				
im Hauptversuch	0,99	0,81	0,71	0,62
für Leucylglycin allein		—0,03		0,05
für Extrakt allein		(0,05)	0,07	0,10
% der max. Spltg. (corr.)	100	79	65	50

Anm. Mit einer Adsorptionsrestlösung ergab sich unter ähnlichen Bedingungen eine Spaltung von 0,31 ccm bei p_H 8,0, 0,17 ccm bei p_H 9,4.



Zeichenerklärung:

- Leber
- Pankreas
- Darm (der linke Ast Glycylglycin)
- Milz
- Hefe

Tabelle 7 c.

Zum Vergleich: Wirksamkeit von (Di-) Peptidasen nach der Literatur (in % der maximalen Spaltung).

pH	5,0	6,0	6,5	7,0	7,4	7,6	7,8	8,0	8,3	8,8
Pankreas [22]	25	—	33	50	—	75	100	—	60	—
Darm [23]	0	(11)	(65)	(87)	93	(93)	100	91	(69)	—
Milz [28]	—	14	—	25	66	82	—	100	89	66
Hefe [26]	0	—	0	—	72	—	100	—	83	9*

* P_H 9,1.

m/3 KH_2PO_4 und ca. 0,26 ccm 2,5 n-NH_3 für je 0,188 g gelöst. Der Betrag der Spaltung unter diesen Bedingungen war der gleiche wie in Gegenwart eines sonst gebräuchlichen NH_3-NH_4Cl-Puffers.) Die Glycerinkonzentration, die anderwärts von Einfluß war, wurde so weit möglich auf etwa 7% gehalten.

Die zur Prüfung der „E·t-Beziehung" gewählten Versuchszeiten (Tabelle 8) verhielten sich umgekehrt wie die Enzymmengen, die Umsätze in entsprechenden Zeiten erwiesen sich als fast gleich und blieben nur in sehr langen Zeiten stärker zurück. Der Reaktionsverlauf genügt recht gut der monomolekularen Gleichung und die monomolekularen Konstanten sind den Enzymmengen proportional. (Diese Proportionalität zwischen Enzymmenge und Spaltungsgeschwindigkeit folgt auch aus den Zeiten gleichen Umsatzes.) Demgemäß läßt sich wie bei Pankreas- und Darmerepsin definieren:

1 Leber-Erepsin-Einheit (im folgenden kurz mit Er.-E. bezeichnet) ist das 1000fache der Enzymmenge, die an 10 ccm m/10 Leucylglycinlösung von p_H 8,0 (und 7% Glyceringehalt) bei 30° die monomolekulare Reaktionskonstante 0,001 gibt. (Die Reaktionskonstante gibt die Zahl der Leber-Erepsin-Einheiten in der Analysenprobe an.)

Tabelle 8.

Reaktionsverlauf und Einfluß der Enzymmenge bei der Erepsinwirkung.

Enzym als Rohextrakt.

Enzym ccm	Min.	Spaltung ccm n/5 KOH	$k = \frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x}$	Enzym ccm	Min.	Spaltung ccm n/5 KOH	k
0,40	15	0,38	0,00229	0,10	60	0,37	0,00055
	30	0,67	208		—	—	—
	45	0,92	196		180	0,93	050
	60	1,29	213		240	1,20	050
	90	1,80	215		360	1,75	052
	120	2,30	223		480	2,10	049
0,20	30	0,38	0,00115	0,05	120	0,34	0,00025
	90	0,98	105		360	0,88	023
	180	1,86	112		720	1,59	023

3. Zur Bestimmung der Protease.

Bei alkalischer Reaktion war keine „tryptische“ Wirkung zu beobachten:

An 5 ccm 6 proz. Caseinlösung von etwa p_H 8,6 trat mit 3 ccm Extrakt in 24 Stdn. nur der Carboxylzuwachs des Blindversuches ein. 15 ccm einer proteasearmen Restlösung (3 mal voradsorbiert) gaben mit 5 ccm 8 proz. Gelatinelösung bei p_H 8,3 in 24 Stdn. keine Spur van Slyke-Stickstoff, auch nicht in Gegenwart von KCN.

Dagegen erfolgte Spaltung von Gelatine bei p_H 4,7. Durch alkoholische Titration ließ sie sich nicht exakt messen, weniger wegen der tiefen Farbe extraktreicher Lösungen als wegen der Neigung gewisser Extraktbestandteile, unter mancherlei Bedingungen auszuflocken; es gelang nicht die schädliche Ausfällung der Gelatine zu vermeiden. Daher bestimmte ich nach dem bei der Lienoprotease[28] bewährten Verfahren die Spaltung durch größere Mengen der proteasearmen Lösungen in 24 Stunden, indem ich den Zuwachs an Aminostickstoff nach van Slyke maß.

Der Ansatz von 20 ccm enthielt 5 ccm 8 prozentige Gelatinelösung und war durch Essigsäure (ohne Puffer) auf p_H 4,7 gebracht; die Bestimmung wurde mit je 8 ccm ausgeführt und daraus die Spaltung im ganzen Ansatz berechnet.

6,0 ccm Rohextrakt gaben so bei 30° in 24 Stunden

Extrakt	I	II	III
Gesamtspaltung	0,68	1,08	1,80 ccm n/5 NH_2.

Der Enzymgehalt der verwendeten Extrakte war von einigem Belang für die Reinigung und sei hier mitgeteilt:

Es enthielten

10 ccm Extrakt	I	II	III	IV	aus getrockneter Drüse
Arginaseeinheiten	3300	3560	4010	3720	2860
Erepsineinheiten	0,0744	0,0244	0,0212	0,0392	0,0295

II. Versuche zur Gewinnung proteolytisch einheitlicher Arginaselösung.

1. Adsorptionsversuche.

Zur Auswahl des geeignetsten Adsorbens verglich ich das Verhalten eines sauren Adsorptionsmittels, des Kaolins, und eines basischen, der Tonerde in der Modifikation C_γ, bei neutraler Reaktion und bei p_H 4,7. Als elektropositives Gel von etwas anderen Eigenschaften zog ich noch das Eisenhydroxyd heran (Tabelle 9). In allen Fällen wurde der Lösung das Erepsin stärker entzogen als die Arginase, nur Kaolin bei neutraler Reaktion war fast ohne Wirkung. Bei saurer Reaktion adsorbierte Eisenhydroxyd auch die Arginase sehr stark, am auswählendsten, daher günstigsten wirkte Aluminiumhydroxyd C_γ. Die weiteren Versuche gingen also dahin, das Erepsin mittels dieses Adsorptionsmittels bei p_H 4,7 aus der Lösung zu entfernen (Tabelle 10). Zweimalige Adsorption setzte

Tabelle 9.

Vergleich verschiedener Adsorbentien.

Zu den Adsorptionsvornahmen wurde der Extrakt mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und auf das gewünschte p_H gebracht, für p_H 4,7 noch $^1/_{10}$ des Gesamtvolumens n/1 Acetatpuffer (1 : 1) zugesetzt. Nach dem Zentrifugieren wurde neutralisiert; Eiskühlung. Zur besseren Übersicht sind alle Angaben auf 10 ccm Rohextrakt umgerechnet.

Die gewählten Mengen Adsorbens sollten annähernd vergleichbare Wirksamkeit besitzen.

Adsorbens Art	Menge (mg)	pH	Enzymgehalt der Restlösung Arginase Einh.	Arginase %	Erepsin Einh.	Erepsin %
a) Extrakt I mit 3300 A.-E., 0,0744 Er.-E.						
Kaolin	500	7,0	3100	91	0,0675	91
"	500	4,7	2320	70	0,0331	45
Eisenhydroxyd	58	4,7	1240	36	0,0198	27
Tonerde C_γ	36	7,0	2370	72	0,0410	55
" C_γ	36	4,7	2160	66	0,0109	15
b) Extrakt aus getrockneter Drüse mit 2860 A.-E., 0,0295 Er.-E.						
Tonerde C_γ	36	7,0	2130	74	0,0185	63
" C_γ	36	4,7	1520	53	0,00765	26

Tabelle 10.

Adsorption mit wechselnden Mengen Tonerde Cγ bei pH 4,7. Vergleiche Vorbemerkung zu Tabelle 9.

Extrakt	Zahl der Ads.	Angewandt mg Al_2O_3	Ausgangslösung			Restlösung				
					Protease*	Arginase		Erepsin		Protease*
			A.-E.	Er.-E.		A.-E.	%	Er.-E.	%	
I	2	36+18	3300	0,0744	0,68	1790	54	0,00062	0,9	0,20
II	2	36+18	3560	0,0244	1,08	2050	56	0,00064	2,6	
II	2	36+18	3560	0,0244	1,08	1530	43	0,00047	1,9	0,20
II	2	36+18	3560	0,0244	1,08	1660	47	0,00129	5,3	
III	2	36+18	4010	0,0212		2090	52	0,00086	4	
IV	2	36+18	3720	0,0392		1870	50	0,0041**	10**	
getr. Drüse	2	36+18	2860	0,0295		1150	40	0,00078	2,7	
I	3	36+9+9	3300	0,0744	0,68	900	27	0,00054	0,7	0,29
I	3	36+18+18	3300	0,0744	0,68	990	29	0,00046	0,6	0,0
II	3	36+18+18	3560	0,0244	1,08	970	27	0,00024	1,0	0,18
II	3	36+18+18	3560	0,0244	1,08	910	26	0,00055	2,2	0,25
II	3	36+18+72	3560	0,0244	1,08	420	12	0,00013	0,5	
III	3	36+18+72	4010	0,0212	1,80	920	23	0,00006	0,3	0,26
III	3	36+18+72	4010	0,0212		930	23	(0,00004)	0	
III	3	36+18+72	4010	0,0212		1260	32	0,00012	0,5	
getr. Drüse	3	36+18+72	2860	0,0295						
IV	3	36+18+72	3720	0,0392		310	11	0,00018	0,6	
IV	3	18+36+72	3720	0,0392		1140	31	0,00018	0,5	
IV (Monate später)	3	18+36+72	(3720)	0,0392		860	23	0,00012	0,3	
I	4	36+18+18+18	3300	0,0744	0,68	370	(10)	0,00016	0,4	
I	4	36+18+9+9	3300	0,0744	0,68	420	12	0,00060	0,8	0,0
IV	4	18+36+36+72	3720	0,0392		570	17	0,00064	0,9	0,0
III	4	36+18+72+150	4010	0,0212		520	14	0,00004	0,1	
						250	6	0,0	0	

* Spaltung in ccm n/5 NH_2 (durch die 6 ccm Extrakt entsprechende Lösungsmenge).

** Mindestwert!

seine Menge schon sehr stark herab, während die Arginaseausbeute noch beträchtlich war; doch ließ sich bei empfindlicherer Prüfung noch eine nennenswerte Erepsinwirkung nachweisen, ja bisweilen war seine Entfernung recht mangelhaft. Viel zuverlässiger war dreimalige Adsorption*; wo es die Arginaseausbeute erlaubte — am günstigsten verhielt sich hier Extrakt III, wenig brauchbar war der Extrakt aus getrockneter Drüse — war die Anwendung einer größeren Menge Adsorbens bei der dritten Adsorption empfehlenswert. Ganz erepsinfreie Restlösungen wurden fast nie erhalten. (Die beobachteten Spaltungen waren nicht etwa durch Selbstspaltung der Enzymlösung vorgetäuscht, deren Carboxylzuwachs erreichte kaum die Fehlergrenze.) Häufigere Adsorption mit kleineren Mengen bot keine Vorteile, ebensowenig Adsorption aus verdünnterer Lösung (Tabelle 11); Alkohol in höherer Konzentration schädigte die Ausbeute stark.

Beispiel für die Gewinnung erepsinarmer Arginase.

15 ccm Extrakt II, enthaltend 5340 A.-E. und 0,0366 Er.-E., wurden in Eis mit 15 ccm Wasser, 3 ccm n/1 Essigsäure-Natriumacetat 1 : 1 sowie etwas Säure versetzt und 3,4 ccm, darauf zweimal 1,7 ccm Tonerdesuspension Cγ (entspr. 54 bezw. 27 mg Al_2O_3) zugefügt; nach jeder Zugabe wurde durchgeschüttelt, in der Zentrifuge abgetrennt, gekühlt. Das Volumen der letzten Restlösung betrug nach dem Neutralisieren 34 ccm. Einwirkung auf Arginin: 0,40 ccm Restlösung gaben in 60 Minuten 11,60 ccm n/50 NH_3 entspr. 17,5 A.-E.; Einwirkung auf Leucylglycin: 3,0 ccm gaben in 300 Minuten 0,19 ccm n/5 COOH entspr. 0,000054 Er.-E.; Einwirkung auf Gelatine: 15,0 ccm Restlösung gaben in 26 Stdn. 0,27 ccm n/5 NH_3. Die Lösung enthielt somit insgesamt 1500 A.-E. = 28% und 0,00061 Er.—E. = 1,7%.

War der Lösung die Hauptmenge des Erepsins durch Voradsorption entzogen, so ließ sich die Arginase an größere Mengen Adsorbens in solchem Betrage binden, dass Elutionsversuche aussichtsreich erschienen. Die Gewinnung brauchbarer Arginaselösungen durch Elution versuchte ich auf verschiedenen Wegen (Tabelle 12): durch Elution mit verdünntem Ammoniak aus Kaolin; Adsorption mit dem stark wirksamen Eisenhydroxyd und Elution

* (vorher trat auch selten völlige Klärung ein.)

Tabelle 11.

Einfluß von Verdünnung und Alkoholzusatz.
Extrakt II mit 3560 A.-E. und 0,0244 Er.-E.; p_H 4,7.

Verdünnung mit	Zahl d. Ads.	mg Al_2O_3	Restlösung			
			Arginase		Erepsin	
			Einh.	%	Einh.	%
1 Vol. Wasser	1	36	1910	54	0,00531	22
1 " "	2	36+18	1350	38	0,00068	2,8
4 Vol. Wasser	1	36	1180	33	0,00262	11
4 " "	2	36+18	950	27	0,00041	1,7
ca. 2/5 Vol. Alkohol +3/5 Vol. Wasser	1	36	810	23	0,00133	$5^1/_2$

mit dem Erepsinsubstrat Leucylglycin, darauf mit Glykokollpuffer vom p_H des Arginaseoptimums; Adsorption an Tonerde, Elution mit Sekundärphosphat oder Phosphat von p_H 6,5. Das letztgenannte Eluens legte sehr viel Erepsin frei, aber bei darauffolgender Elution mit Sekundärphosphat wurde wieder Erepsin gefunden. In jedem Fall waren die Erepsinausbeuten viel höher als der Prozentsatz freigelegter Arginase; einigemal ergab sich aus den zum Teil beträchtlichen Spaltungen im Bestimmungsansatz, dass die Erepsinwirkung in der Elution ein Mehrfaches des Betrages erreichte, um den sie in der Restlösung abgenommen hatte. Ob diese Erhöhung der Wirksamkeit bei schwach alkalischer Reaktion auf Entfernung eines Hemmungskörpers, auf Neubildung oder auf Aktivierung des Enzyms beruht, wurde nicht entschieden.

Neben der Adsorption an Gele wurde auch die weit ältere Methode (schon Th. Schwann 1836[62]), Enzyme mit in der Lösung erzeugten Fällungen niederzuschlagen, in einigen Fällen versucht:

Durch Caseinfällung wurde ein Teil der Arginase, aber jedenfalls nicht die Hauptmenge des Erepsins entfernt.

10 ccm Rohextrakt II wurden mit 10 ccm 6prozentiger Caseinlösung (Hammarsten) vermischt und in Kältemischung mit 1,4 ccm n/1-Essigsäure gefällt, 12 ccm des (neutralisierten) Filtrats enthielten 1490 A.-E. und mindestens 0,0036 Er.-E., entspr. 73% der Arginase und mindestens 26% des Erepsins.

[62] Arch. f. anat. Phys. **1836**, S. 90.

Tabelle 12.

Elutionsversuche.

Die Lösungen (Nr. 1 bis 4 Extrakt II, Nr. 5 Extrakt III) waren mit 36 + 18 mg Al_2O_3 ($C\gamma$) vorgereinigt; pH bei der Adsorption 4,7; die Elutionsflüssigkeiten enthielten zur Stabilisierung ca. 20 Vol.-Proz. Glycerin; eluiert wurde durch Anreiben, in Versuch 5a wurde bei pH 6,5 kurz stehen gelassen. Der negative Erepsinbefund in Versuch 5b besagt bei der großen Verdünnung nichts.

(Die Angaben beziehen sich wieder auf 10 ccm Rohextrakt.)

	Adsorbens	Ausgangslösung		Abnahme %		eluiert mit	% des adsorbierten	
		A.-E.	Er.-E.	Arginase	Erepsin		Arg.	Ereps.
1	Kaolin 560 mg	1500	0,00052	35	35	24 ccm n/50 NH_3	16	160
2	Eisenhydroxyd 120 mg	1400	0,00044	76	77	20 ccm n/10 Leucylglycin von pH 7,0, darauf 15 ccm n/10 Glykokollpuffer von pH 9,5	4 13	20 42
3	Tonerde $C\gamma$ 72 mg	1420	0,00080	70	75	27 ccm m/10 Sekundärphosphat*	36	72
4	Tonerde $C\gamma$ 72 mg	1420	0,00042	70	66	47 ccm m/10 Phosphat von pH 6,5**	25	360
5a	Tonerde $C\gamma$ 72 mg	2160	0,00078	57	95	40 ccm m/10 Phosphat von pH 6,5, darauf 30 ccm m/10 Sekundärphosphat	21 11	70 160
5b	Tonerde $C\gamma$ 72 + 144 mg	2400	0,00118	90	100	75 + 37 + 37 ccm m/10 Phosphat von pH 6,5,** darauf ebenso viel Sekundärphosphat	42 10	(0) (nicht über 40)

* etwa fünffaches Gewicht der Tonerde.

** etwa neunfaches Gewicht der Tonerde.

Auch bei der Ausfällung von Tyrosin aus seiner alkalischen Lösung nahm die Menge der Arginase stärker ab als die des Erepsins.

Die Restlösung (24 ccm) der Adsorption mit 36+18 mg Al_2O_3 aus 10 ccm Extrakt II wurde mit dem gleichen Volumen n/10 Tyrosinlösung (430 mg mit 2 Mol NaOH) vermischt und das Tyrosin durch (4,8 ccm) n-Essigsäure gefällt und an der Zentrifuge abgetrennt.

In Versuch 1 wurde das Tyrosin in mehreren Fraktionen gefällt.

	vor der Fällung	nach der Fällung	
Versuch 1.	1990 A.-E.	1000 A.-E.	= 50 %
	0,00065 Er.-E.	0,00045 Er.-E.	= 70 %
Versuch 2.	1530 A.-E.	1000 A.-E.	= 65 %
	0,00047 Er.-E.	0,00043 Er.-E.	= 90 %

Durch Quecksilberchlorid ließ sich die Arginase der Lösung fast völlig entziehen; die Wiedergewinnung einer nennenswerten Menge des säureempfindlichen Enzyms durch Zersetzung des Niederschlages gelang nur, wenn bei allen Operationen stark gepuffert wurde. (Das Erepsin wurde nicht verfolgt.)

20 ccm einer mit 18 + 36 + 72 mg Al_2O_3 (C_γ) vorgereinigten Lösung aus Extrakt IV wurden mit 3 ccm n-Natriumacetat* und 1,1 ccm (Überschuss) halbgesättigter Sublimatlösung versetzt. In die nach dem Zentrifugieren erhaltene Lösung wurde H_2S geleitet, das Sulfid abfiltriert, das Filtrat (p_H etwa 5,5) neutralisiert und der Schwefelwasserstoff bei Zimmertemperatur verjagt. Die rötliche Quecksilberfällung wurde mit 15 ccm Wasser und 3 ccm Natriumacetat angerieben und die Suspension der gleichen Behandlung mit H_2S unterworfen; beim Luftdurchsaugen schied die schäumende gelbliche Flüssigkeit eiweißartige Flocken ab.

In der Ausgangslösung	230 A.-E.	
in der Restlösung	7 A.-E.	= 3 %
aus der zersetzten Fällung	66 A.-E.	= 29 %

Trockenpräparat.

Die Restlösung wurde entweder mit 3 Vol. Aceton gefällt oder schonender mit $^1/_3$ Volumen Äther überschichtet und Aceton (ca. $1^1/_2$ Vol.) zugefügt, bis sich die Schichten mischten; die Fällung wurde an der Zentrifuge mit Aceton und Äther gewaschen. Zur Gehaltsbestimmung wurde eine gewogene Probe der bräun-

* Dieser Zusatz war auch zur Erzielung einer brauchbaren Fällung nötig.

lichen Masse gut mit Wasser oder Glycerin angerieben; Auflösung war namentlich bei dem mit Aceton erhaltenen Präparat kaum sichtbar. Starke Kühlung beim Fällen erhöhte die Arginase-Ausbeute nicht.

Aus 20 ccm mit 18 + 36 + 72 mg Al_2O_3 voradsorbierter Lösung (Extrakt IV), enthaltend 570 A.-E. und 0,00015 Er.-E., fällte

Aceton allein	51,9 mg Trockenmasse mit	95 A.-E. = 17%
		0,000045 Er.-E. = 30%
Äther-Aceton	44,4 mg " " "	158 A.-E. = 28%
		0,000111 Er.-E. = 70% (?)

Dialyse: 35 ccm einer Restlösung aus Extrakt IV (vorgereinigt mit 18 + 36 + 72 mg C_γ) wurden 45 Stdn. lang in einer Tierblase gegen destilliertes Wasser dialysiert; sie wurde dabei fast farblos, war mit Flocken durchsetzt und ihr Volumen stieg auf 73 ccm; der Arginasegehalt sank von 875 auf 380 A.-E. = 43%.

2. Beständigkeitsversuche.

Wurde roher Glycerinextrakt (in kleinen Proben) einige Zeit im Wasserbad auf 65° gehalten, so zeigte er schon bald eine viel geringere Arginasewirkung, erst später stärkere Abnahme des Erepsins. Die Flüssigkeit wurde dabei so zähe, dass sie sich nur ungenau abmessen ließ.

Erhitzungsdauer	30	60	120 Min.
Arginase	19	17	16% der urspr. Menge
Erepsin	85	71	48% " " "

Versuche über die zerstörende Wirkung wechselnder Wasserstoffionenkonzentration wurden an Restlösungen der Tonerdeadsorption ausgeführt, die Reaktion mit verdünnter Säure oder Lauge eingestellt und zur Bestimmung wieder neutralisiert, wobei fast regelmäßig stärkere Ausflockung eintrat. Die Arginase war gegen extremere p_H weit empfindlicher als die Erepsinreste (Tabelle 13). Dagegen ist ihre Haltbarkeit bei neutraler Reaktion auch in den Restlösungen recht gut (Tabelle 14). Es erscheint nicht ausgeschlossen, dass eine Schädigung der Arginasewirkung gerade mit flokkungs- oder gerinnungsartigen Vorgängen verknüpft ist (Phenylhydrazin, $HgCl_2$, Erhitzen, Alkohol). Auffallend ist die „Vermeh-

rung“ des Erepsins bei p_H 9; ähnliches scheint sogar unter den Bedingungen der Erepsinbestimmung gelegentlich beobachtbar (Zunahme kleiner k-Werte bei langer Bestimmungszeit).

Tabelle 13.

Beständigkeit der Restlösungen bei wechselndem p_H.

Lösungen aus Extrakt II, adsorbiert mit 36 + 18 mg Al_2O_3. Versuchstemperatur: Versuch 1 und 2 Zimmertemperatur, Vers. 3 bis 5 0°. (Angaben für 10 ccm Rohextrakt).

	p_H	anfangs A.-E.	anfangs Er.-E.	nach Stdn.	A.-E.	%	Er.-E.	%
1	7,0	1550	0,00178	4	1790	116	0,00134	75
				24	1630	105	0,00118	66
2	9,0	1550	0,00178	4	1690	109	0,00279	156*
				24	1460	94	0,00374	210*
3	10,5	1520	0,00061	2	850	56	0,00057	93
				4	675	44	0,00073	120
4	>12	1360	0,00102	2	0	0	0,00032	34
				4	0	0	(0)	(0)
5	3,0	1420	0,00053	2	(20)	(2)	0,00018	34
				4	(20)	(2)	0,00021	40

* 4,44 ccm spalteten in 6 Stdn. anfangs 1,12, nach 4 Stdn. 1,30, nach 24 Stdn 1,83 ccm n/5 COOH.

Tabelle 14.

Längere Aufbewahrung neutraler Restlösungen.

Aus Extrakt III, 36 + 18 + 72 mg Al_2O_3 Cγ; Eisschrank.

5,0 ccm enthielten:

a) Tag	A.-E.	%	b) Tag	A.-E.	%	Er.-E.	%	
1.	171	100	1.	231	100	0,000019	100	(2. Tag)
2.	143	84	4.	201	88			
6.	150	88	7.	130	58	0,000021	(110)	

3. Hemmung und Vergiftung.

Wurde ein Teil des Substrats durch das ereptisch schwer spaltbare Glycylglycin ersetzt, so trat keinerlei Hemmung ein.

a) gewöhnlicher Ansatz, in b) $^1/_{10}$ des Leucylglycins durch die äquivalente Menge Glycylglycin ersetzt; je 0,8 ccm Rohextrakt, 75 Minuten.

In a) 1,15, in b) 1,14 ccm Carboxylzuwachs.

Der Zusatz von Quecksilberchlorid erfolgte in zweierlei Weise. In Versuch 1 der Tabelle 15 wurde zu beiden Bestimmungsansätzen (und zwar unmittelbar vor der Substratzugabe) eine etwa gleiche Menge Sublimatlösung gefügt; in Versuch 2 wurde das „Gift" zur Restlösung gegeben einige Minuten ehe ihr die Bestimmungsproben entnommen wurden. In beiden Fällen trat Flockung ein; ob ein Zusatz von Thiosulfat bei der Harnstoffbestimmung

Tabelle 15.

Vergiftungsversuche I.

Angewandt wurden z. T. 2 bis 3 mal adsorbierte Restlösungen, z. T. Rohextrakt. Die Zusätze wurden natürlich auf das pH der Bestimmung gebracht. Verglichen sind die Spaltungen durch verschiedene, aber im einzelnen Versuch konstante Lösungsmengen (die Werte in [ ] sind extrapoliert).

	Gift	Extrakt	ohne Gift Arg. ccm	ohne Gift Er. ccm	mit Gift n.	Arginase ccm	Arginase %	mit Gift n.	Erepsin ccm	Erepsin %
	$HgCl_2$									
1	ohne Inkub.	II 2 mal	8,01	0,12	0,0018	1,96	23	0,0015	0,06	50
2	mit "	adsorbiert	[16,00]	0,20	0,00015	8,07	50	0,00225	0,23	(110)
3	Phenyl-hydrazin	II 2 mal adsorbiert	[17,10]	0,69	0,03	6,33	37	0,03	0,59	85
4	Sulfit	IV roh	18,66	0,51	0,05	16,63	89	0,05	>0,37	(73)
5	"	IV 3 mal adsorbiert	11,41	0,41	0,05	10,52	92	0,05	0,42	100
6	H_2S	IV roh	18,66	0,51	0,05	19,35	104	0,05	0,18	34
7	"	IV 3 mal adsorbiert	11,41	0,41	0,05	15,52	137	0,05	—0,06	0

Anmerkung 1. Bei der „Inkubation" war die Giftkonzentration: in Versuch 2 0,0075 n-$HgCl_2$, in Versuch 3 für Arginase 0,12 n-, für Erepsin 0,06 n-Phenylhydrazin.

Anmerkung 2. Der negative Ausschlag beim Sulfid entsprach genau der Titerabnahme (Polysulfid?) einer Sulfidlösung von gleichem pH. Der Umschlag war viel deutlicher als bei Sulfit und Cyanid.

genügte, um die sehr quecksilberempfindliche[63] Urease zu schützen und damit eine Entstellung der Arginasewerte zu verhindern, ist nicht ganz sicher.

Phenylhydrazin zeigt nach v. Eulers Erfahrungen[39] seine volle Wirksamkeit gegen Darmerepsin erst nach einer gewissen Inkubationszeit. Darum ließ ich es (angewandt als umkristallisiertes Chlorhydrat) 20 Minuten bei 30° und dem p_H der Bestimmung auf die angewandten Enzymmengen wirken, ehe die Bestimmung begann (Tabelle 15, Nr. 3). Die starke Herabsetzung der Arginasewirkung hängt vielleicht mit kolloiden Vorgängen zusammen (beim Erhitzen trat ungewöhnlich starke Flockung auf); die Urease war unter den Versuchsbedingungen voll wirksam.

Sulfit, als Natriumsulfit von Kahlbaum, ohne Inkubation angewandt, besaß nur für Arginase ein schwaches Hemmungsvermögen (Tabelle 15, Nr. 4 u. 5).

Kaliumcyanid zeigte auch ohne Inkubation seine volle hemmende Wirkung gegen Erepsin, die in größeren Mengen dessen Tätigkeit völlig unterdrückte (Tabelle 16, Nr. 3 u. 5); aber diese

Tabelle 16.

Vergiftungsversuche II: Kaliumcyanid.

Während der Inkubation war die KCN-Konzentration doppelt so hoch wie in der Bestimmung, das p_H 7,0. Spaltungen durch jeweils gleiche Lösungsmengen und Zeiten.

	Extrakt	ohne Arg. ccm	KCN Er. ccm	Inkubation	mit KCN n.	Arginase ccm	Arginase %	Erepsin ccm	Erepsin %
1	II 2 mal ads.	12,40	0,28	ohne	0,006	22,13	178	0,21	75
					0,012	19,75	160	0,15	53
2	III roh	9,06	—	ohne	0,006	7,77	83	—	—
3	III 3 mal ads.	12,95	0,09	kurz	0,025	8,83	68	(0,02)	0
4	III 3 mal ads.	12,32	—	40 Min.	0,025	12,27	100	—	—
5	III 2 mal ads.	18,11	0,57	ohne	0,050	9,84	54	0,05	(9)
				45 Min.	0,050	13,75	76	0,00	0

[63] M. Jacoby, Biochem. Z. **76**, 275 (1916).

Mengen hemmten auch die Arginase etwas und diese erreichte wieder höhere Wirksamkeit, wenn eine Inkubationszeit (und zwar bei neutraler Reaktion) eingeschaltet wurde (Tabelle 16, Nr. 5). Die — allerdings nicht bei allen Extrakten beobachtete — sehr starke Aktivierung der Arginase durch kleinere Cyanidmengen (Tabelle 16, Nr. 1) kann höchstens zum Teil als p_H-Effekt oder dergleichen erklärt werden.

Bei Anwendung der Blausäurevergiftung zu Spezifitätsversuchen erhielt ich (in Kontrollen mit bekannter Argininmenge) Zuwachse an Ammoniak, die mehr als 100 % Spaltung entsprachen. Der Ausschlag wurde weder von der Enzym- (Rest-)lösung (Tabelle 17, Nr. 1) noch vom KCN für sich gegeben (Tabelle 17, Nr. 2); der Effekt beruht vielmehr auf dem Zusammenwirken von Begleitstoffen der Restlösung und dem Cyanid. Er trat in gleicher Größenordnung mit verschiedenen Extrakten ein (Tabelle 17, Nr. 4, 12, 13), und zwar auch dann, wenn das Enzym durch Kochen zerstört war (Nr. 10), dagegen blieb er aus, wenn die Restlösung dialysiert war (Nr. 11). Wurde bei konstanter Cyanidmenge die Restlösungsmenge variiert (Nr. 6 bis 8) oder umgekehrt (Nr. 3 bis 5), so stieg der Ausschlag langsamer an als proportionalem Gang entspräche; unter den Bedingungen der Anwendung schien hauptsächlich die Restlösungsmenge bestimmend für die Größe des Effekts. Gegenwart von Clupein schien ohne merklichen Einfluß (Nr. 16, 17). Man darf wohl annehmen, dass sich das Cyanid an einen Bestandteil des Extraktes, etwa nach Art der Cyanhydrine, allmählich anlagert und in dieser Form leicht verseift wird.

Ein ebenso wirksames Gift wurde im Schwefelwasserstoff gefunden. Er wurde angewandt als $Na_2S \cdot 9H_2O$ von Kahlbaum; Inkubation wurde nicht versucht, da die Ergebnisse nichts zu wünschen übrig ließen (Tabelle 15, Nr. 7)*. Die „Nebenreaktion" wie mit KCN fehlte natürlich. An Urease war eine größere Menge nötig als sonst (s. S. 27); mit dieser Vorsicht ließen sich

* Die Ähnlichkeit mit der Blausäurewirkung scheint sich in diesem Versuch auch in einer Aktivierung der Arginase zu äußern.

Tabelle 17.

Reaktion zwischen Restlösung und Cyanid.

Das pH betrug 9,0, das Volumen der Bestimmungseinheit in der Regel 15 ccm; 37°; Aufarbeitung wie bei der Arginasebestimmung. Restlösungen von 36 + 18 + 72 mg Al_2O_3, wo nicht anders bemerkt, aus Extrakt III. Vom Anfangswert ist für Leerverbrauch der Urease usw. 0,4 ccm abgezogen.

Nr.	KCN ccm n/1	E ccm	Clupein in g	Vorbehandlung	Anfangswert ccm n/50 NH_3	Zuwachs in 24 Std.
1	—	9,0	—	—	1,0	0,3
2	0,37	—	—	—	0,16	0,03
3	0,08	9,0	—	—	1,5	1,1
4	0,37	9,0	—	—	1,5	2,9
5	1,85	9,0	—	—	1,6	6,2
6	0,37	0,90	—	—	0,3	0,6
7	0,37	2,25	—	—	0,7	0,9
8	0,37	8,8	—	—	1,4	2,8
9	0,37	8,8	—	45 Min. Inkub. bei pH 7	1,5	2,7
10	0,37	9,0	—	Enzym-Lsg. 40 Min. auf 100° erhitzt.	1,1	2,6
11	0,37	9,0 Extr. IV	—	Enzymlösung dialysiert	0,0	0,15
12	0,37	9,0 Extr. IV	—	—	1,3	2,0
13	0,37	9,0 Extr. aus getr. Drüse	—	—	0,8	2,8
14	0,37	—	0,128	—	0,2	0,24
15	1,85	—	0,128	—	0,3	1,2
16*	0,75	9,0	0,128	—	1,0	3,2**
17*	0,75	9,0	0,128	45 Min. Inkub. bei pH 7	1,5	2,9

fast quantitative Werte erhalten, wenn das Verfahren zur Argininbestimmung angewandt wurde; eine störende Veränderung des

* 30 ccm Ansatz.

** „ = 5% des Arginins im Clupein."

gebildeten Harnstoffs trat auch in langen Zeiten nicht ein (Tabelle 18).

Versuchsreihe 18.

Quantitave Argininspaltung in Gegenwart von Na_2S.

In diesen wie in den Spezifitätsversuchen (und in Tabelle 17) wurde kein Puffer zugesetzt, um das Volumen bei der Ammoniakbestimmung möglichst klein zu halten; hatte sich das pH stärker (nach der sauren Seite) verschoben, so wurde es mit etwas Lauge wieder hergestellt.

Je 20 ccm Ansatz von pH 9,1 ccm m/2 Na_2S (also n/20); Restlösungen aus Extrakt IV (18+36+72 mg Al_2O_3).

1.) Arginin als Carbonat, 50,0 mg, 7 ccm Restlösung mit 113 A.-E.

in Stunden	6	24	48	168
Spaltung ccm n/50 NH_3	27,81	27,95	27,96	28,12
%	96,9	97,4	97,5	98,1

2.) Arginin als Salminhydrolysat. (0,9940 g eines Präparates von Salminsulfat mit 61,5 % freiem Salmin wurden in 10 ccm konzentrierter Salzsäure warm gelöst, 10 Stdn. am Rückfluß zum Sieden erhitzt, die Salzsäure bei 11 mm und unterhalb 35° möglichst verjagt und der bräunliche Sirup zu 50 ccm gelöst).

In a) 4 ccm Hydrolysat entspr. 51,4 mg Salmin oder 43,7 mg Arginin, 125 A.-E. (7 ccm Restlösung);

in b) 3 ccm Hydrolysat entspr. 38,8 mg Salmin oder 33,0 mg Arginin, 120 A.-E. (7 ccm Restlösung.)

	Spaltung	
in Stunden	a)	b)
6	25,07 ccm = 99,1 %	18,41 ccm = 97,0 %
24	24,74 ccm = 98,0 %	18,34 ccm = 96,7 %
95	25,23 ccm = 99,7 %	

Es sei bemerkt, dass auch ein Protein (Gelatine) die Bestimmung nicht störte.

20 ccm Ansatz von pH 9 enthielten 50,0 mg Arginin als Carbonat, 150 mg Gelatine (als 3 ccm 5prozentige Lösung) und 1 ccm m/2 Na_2S, 7 ccm Restlösung mit 120 A.-E.

Spaltung in 6 Stunden 27,91 ccm = 97,2 %
„ „ 24 „ 27,91 ccm = 97,2 %

III. Spezifitätsversuche an synthetischen Substraten.

d-Dibenzoyl-arginin.

Da die Substanz nicht freien Harnstoff, sondern Benzoylharnstoff liefern würde, verfolgte ich die Reaktion durch Messung des Aminostickstoffs nach van Slyke, mit 15 Minuten langem Schütteln. Es wurde keine Spaltung gefunden:

In 7 ccm von pH 9 87,1 mg Dibenzoyl-arginin (entspr. 39,7 mg Arginin), 3,4 ccm Restlösung (Extrakt IV; 18+36+72 mg Al_2O) mit 96 A.-E. Kontrollansätze mit Substrat bezw. Enzym allein.

Gefunden wurde nach Stunden	Hauptversuch	Substrat allein	Enzym allein
0	1,42	0,27	1,24 mg N_2
24	1,42	0,23	1,13 „ „
48	1,23	0,27	1,23 „ „

„Arginyl-arginin“ (dl-α, δ-Bisguanido-n-valeriansäure-anhydrid).

Das Pikrat wurde nach der Vorschrift von Zervas und Bergmann[58] gewonnen (es war hartnäckig mit öliger Substanz verunreinigt, die Ausbeute an Nitrat dementsprechend gering). Ich zerlegte es nach der Angabe von Fischer und Suzuki[57] mit Salpetersäure, nahm den mit Alkohol gewaschenen Eindampfrückstand zwecks Entfärbung mit Tierkohle nochmals auf und engte (wieder bei 12 mm) zu starker Kristallisation ein. Das erhaltene Dinitrat zersetzte sich sehr plötzlich gegen 192° (unkorr.) und gab bei 10 Minuten Schütteln 0,5 Prozent seines Gewichtes (oder 1,9 Prozent seines Basenstickstoffs) an van Slyke-Stickstoff. (Zervas und Bergmann geben 189° korr. und 0,6 Prozent van Slyke-N an.)

Die gefundene kleine Spaltung ist, wie der Kontrollversuch zeigt, sicher noch zu hoch.

In 14 ccm von pH 9 56,1 mg Dinitrat* und 62 A.-E. (4,7 ccm Restlösung aus Extrakt IV, 18+36+72 mg Al_2O_3; 0,50 ccm: 5,63 ccm n/50 NH_3: 6,6 A.-E.; 5,0 ccm, 6 Stdn.: 0,11 ccm n/5 KOH: 0,000028 Er.-E.).

Gehalt an n/50 NH_3:

anfangs 0,77 ccm, nach 6 Stdn. 1,59 ccm, nach 24 Stdn. 1,77 ccm.

* Der Guanidogehalt entspräche 30 mg Arginin.

Kontrollversuch ohne Enzym:

anfangs 0,93 ccm (!), nach 23 Stdn. 1,12 ccm.

Kontrolle der Enzymwirksamkeit: 32,0 mg d-Arginin (Carbonat), gleiche Bedingungen:

Spaltung in 6 Stdn. 17,36 ccm = 94,5 %
„ 24 „ 17,74 ccm = 96,6 %

(Aus der Differenz der NH_3-Endwerte im Haupt- und im Kontrollversuch ergäbe sich eine Spaltung von 0,65 ccm n/50 NH_3 entspr. 1,3 Prozent des Gesamtstickstoffs oder 7,5 Prozent des Harnstoffs, der aus nur einer Guanidogruppe einer Komponente des Racemats entstehen könnte.)

Anm. Ein besonderer Versuch zeigte, dass Nitrat die Bestimmung nicht stört. In 20 ccm Ansatz von pH 9 50,0 mg Arginin (Carbonat), 28,6 mg Kaliumnitrat (etwa 1 Mol), 7 ccm Restlösung mit 125 A.-E.

Spaltung in 23 Std. 27,43 ccm = 95,5 %
in 95 „ 27,65 ccm = 96,3 %

d-Phenylalanyl-d-arginin.

Durch Vermittlung von Herrn Professor Dr. E. Waldschmidt-Leitz erhielt ich von Herrn Professor Dr. M. Bergmann liebenswürdiger Weise eine kleine Menge seines Präparates, wofür ich Herrn Professor Bergmann meinen ergebensten Dank ausspreche.

Um Störungen, etwa durch Alkaliwirkung, zu vermeiden (für einen Kontrollversuch reichte die Menge nicht) wurde die Einwirkungszeit kurz, die Enzymmenge dafür sehr reichlich bemessen. Der beobachtete kleine Ammoniakzuwachs, der 4,6 Prozent des Arginins entspräche, übersteigt kaum die Versuchsfehler: das Peptid ist unspaltbar.

(Enzymlösung aus Extrakt IV, mit 18 + 36 + 72 mg Al_2O_3; 0,75 ccm: 8,20 ccm n 50 NH_3: 11,2 A.-E.; 5,0 ccm, 320 Min.: 0,12 ccm n/5 KOH: 0,000033 Er.-E.; 4,6 ccm in n/20 Na_2S, 320 Min.: — 0,06 ccm KOH: 0 [vgl. Tabelle 15, Anm. 2.].)

In 12 ccm von pH 8,7 25,0 mg Peptid (entspricht 11,0 mg Arginin), 0,6 ccm m/2 Na_2S, 5,0 ccm Restlösung mit 75 A.-E.

Zuwachs in 250 Min. 0,29 ccm n/50 NH_3.

Kontrolle der Enzymwirkung: 50,0 mg Arginin als Carbonat (also $4^1/_2$mal so viel) unter gleichen Bedingungen:

Zuwachs in 250 Min. 28,19 ccm = 98,2 %.

Herrn Professor Dr. K. Felix, in dessen Laboratorium ich einige Versuche dieses Abschnittes ausführen durfte, möchte ich an dieser Stelle herzlich für sein Entgegenkommen danken.

IV. Versuche an Protaminen und deren Abbauprodukten.

Die unveränderten Protamine, in Form ihrer Sulfate bei p_H 9,5 untersucht, zeigten sich in 24 Stunden als nicht spaltbar durch Arginase (Tabelle 19). Die untersuchten Verdauungsprodukte (Tabelle 20) lagen in Form von Lösungen vor, die im Rahmen der Arbeiten über fraktionierten enzymatischen Abbau der Protamine erhalten wurden; die angewandten proteolytischen Enzyme waren nach völligem Stillstand der Spaltung durch Erhitzen inaktiviert. Zur Hemmung des Erepsins enthielten die Ansätze $^1/_{40}$ ihres Volumens an n/1 KCN (40 Minuten Inkubation bei p_H 7, 30° und doppelter KCN-Konzentration); der dadurch verursachte Fehler der Resultate wurde auf Grund der oben erwähnten Versuche (Tabelle 17) annähernd eliminiert.

Dass sich Papain und Trypsin in der Art ihrer Wirkung unterscheiden, wurde schon im allgemeinen Teil betont; dort wurde

Tabelle 19.

Arginase und Protamine.

a) Je 20 ccm von p_H 9,5 mit 5,0 ccm n/10 Glykokoll-NaOH-Puffer; Restlösung (36 + 18 + 18 mg Al_2O_3) aus Extrakt II; Protamine als Sulfat.

	Protamin	mg Protamin	entspr. mg Arginin	Enzym ccm	Enzym A.-E.	Stunden	Spaltung ccm n/50 NH_3	Spaltung % vom Arginin
1	Clupein	97,3	83,1	1,0	$32^1/_2$	2	0,18	(0,4)
						24	0,40	(0,8)
2	Salmin	113,6	96,7	1,0	$44^1/_2$	24	0,23	(0,4)
3	Scombrin	113,6	97	1,0	$44^1/_2$	24	0,28	(0,5)

b) Bedingungen ähnlich Tab. 20: Restlösungen (36 + 18 + 72 mg Al_2O_3) aus Extrakt III, kein Puffer, $^1/_{40}$ des Bestimmungsvolumens n/1 KCN (mit Inkubation). Protamine als Sulfat.

	Protamin	mg Protamin	entspr. mg Arginin	Enzym ccm	Enzym A.-E.	PH	Vol. ccm	Stdn.	Spaltung ccm n/50 NH_3	Spaltung % vom Arginin
4	Clupein	127,8	109,2	9,0	356	9,0	30	8	0,33	(0,5)
								24	0,29	(0,5)
5	Salmin	130,6	111,2	1,5	51,6	8,5	20	24	0,17	(0,3)

auch auf die quantitative Bedeutung des Versuchs mit Clupein (Tabelle 20, Nr. 7) hingewiesen.

Tabelle 20.

Abbauprodukte von Protaminen.

Restlösungen (36 + 18 + 72 mg Al_2O_3) aus Extrakt III, (kein Puffer), $^1/_{40}$ des Bestimmungsvolumens (also wechselnde Mengen) n/1 KCN (mit Inkubation, s. Tab. 16). Die Spaltungswerte sind, wie auch in Tab. 19 b, wegen der KCN-„Nebenreaktion" (nach den Versuchen der Tab. 17) korrigiert.

	Verdauungsprodukt durch	aus mg Protamin	entspr. mg Arginin	Enzym ccm	Enzym A.-E.	PH	Vol. ccm	Stdn.	Spaltung ccm n/50 NH_3	Spaltung % vom Arginin
	A. Salmin:									
1	inaktives Trypsin	129,2	109,9	1,5	51	8,5	20	6	13,56	21,5
								24	14,55	23,0
2	Papain-Blausäure nach Trypsin	113,8	96,9	1,5	43	8,5	20	19	12,84	23,1
3	Trypsin-Kinase nach Papain-HCN nach Trypsin	65,0	55,3	1,8	62	8,5	15	$5^3/_4$	16,78	52,8
								24	22,21	69,9
4	Papain-Blausäure	129,2	109,9	3,6	124	8,5	20	$5^1/_2$	0,38	0,6
								24	0,50	0,8
5	inakt. Trypsin nach Papain-HCN	145,0	123,4	10,8	378	8,5	25	$4^1/_4$	(16,00)	(23)
								25	19,59	27,6
6	Trypsin-Kinase u. Trypsin n. Papain-HCN	39,0	33,2	3,95	142	9,0	15	9	15,33	80,4
								23	15,46	81,1
	B. Clupein:									
7	inakt. Trypsin	126,5 (39,1 mg N_2)	108,1	9,6	434	9,0	30	8	12,80 13,16	20,6 21,2
								24	13,62	21,9

Lebenslauf.

Am 19. September 1903 wurde ich, Herbert Finkelscherer, zu München als Sohn des Rabbiners Dr. Israel Finkelscherer und seiner Frau Bella, geb. Lewy, geboren. Ich besuchte drei Jahre die Volksschule und acht Jahre das Wittelsbacher-Gymnasium zu München, das ich Juli 1920 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Im Herbst desselben Jahres bezog ich die Universität München und widmete mich dem Studium der Chemie. Meine anorganische Ausbildung erhielt ich unter Herrn Prof. Dr. W. Prandtl, die organische unter Herrn Prof. Dr. E. Schmidt, die physikalisch-chemische unter Herrn Prof. Dr. K. Fajans. Das erste Verbandsexamen legte ich am 15. Februar 1924, das zweite am 30. Oktober 1925 ab. Dann begann ich meine Promotionsarbeit, die ich im Sommer 1928 beendete.